



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE PER LA SALUTE

TESI DI DOTTORATO XXIV CICLO

S.S.D. MED 07

***STUDIO DELL'ESPRESSIONE DI SPECIFICI RECETTORI DI
SUPERFICIE NEL CONTESTO DELL'UROTELIO E
VALUTAZIONE DEL LORO POSSIBILE IMPIEGO NELLA
TERAPIA DELLE INFEZIONI CRONICO-RICORRENTI DELLE
VIE URINARIE***

Coordinatore:

Chiar.mo Prof.

Guido M. GRASSO

Docente guida:

Chiar.mo Prof.

Roberto M.A. DI MARCO

Dottoranda:

Daniela SFERRA

Matr. 141390

Anno accademico 2010/2011

Al mio piccolo tesoro in arrivo

INDICE

<u>1. INTRODUZIONE</u>	<u>1</u>
<u>1.1 EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO</u>	<u>1</u>
<u>1.2 EZIOLOGIA</u>	<u>3</u>
<u>1.3 PATOGENESI DELLE INFEZIONI DEL TRATTO URINARIO</u>	<u>5</u>
<u>1.4 <i>ESCHERICHIA COLI</i> ED UROTELIO: ESEMPIO EVOLUTIVO DI INTERAZIONE OSPITE-PARASSITA</u>	<u>7</u>
<u>1.4.1 LE UROPLACHINE</u>	<u>9</u>
<u>1.5 STRATEGIE MICROBICHE PER L'INTERAZIONE CON L'UROTELIO E MECCANISMI DI DIFESA DELL'OSPITE</u>	<u>14</u>
<u>1.6 RAPPORTO UROTELIO-SISTEMA NERVOSO E AGENTE INFETTANTE: UN TRIANGOLO TUTTO DA SCOPRIRE</u>	<u>22</u>
<u>2. SCOPO DELLO STUDIO</u>	<u>25</u>
<u>3. MATERIALI E METODI</u>	<u>32</u>
<u>3.1 BATTERI E LINEE CELLULARI</u>	<u>32</u>
<u>3.2 MODELLI ANIMALI</u>	<u>32</u>
<u>3.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELL'MRNA MEDIANTE RT-PCR E RT-QPCR</u>	<u>33</u>
<u>3.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT</u>	<u>40</u>
<u>3.5 ANALISI IN IMMUNOISTOCIMICA</u>	<u>43</u>
<u>3.5.1 IMMUNOFLUORESCENZA</u>	<u>44</u>
<u>3.5.2 IMMUNOPEROSSIDASI</u>	<u>44</u>

<u>3.6 SAGGIO DI INTERNALIZZAZIONE BATTERICA</u>	<u>45</u>
<u>3.7 MISURAZIONE DEI LIVELLI DI CAMP</u>	<u>47</u>
<u>4. RISULTATI</u>	<u>49</u>
<u>5. CONCLUSIONI</u>	<u>70</u>
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	<u>75</u>

1. INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia e fattori di rischio

Le infezioni del tratto urinario (UTIs) rappresentano una delle affezioni di maggiore riscontro nella pratica medica. Negli Stati Uniti rappresentano la seconda causa di visite mediche e costano al sistema sanitario più di \$ 2 bilioni all'anno; durante la vita, il 10-20% delle donne americane riceve attenzioni mediche per questa tipologia di infezione e circa il 3% svilupperà più di un'infezione urinaria nel corso di un anno[1],[2].

Le infezioni del tratto urinario sono causate da un vasto gruppo di batteri, in grado di risalire il tratto urinario, stabilire una popolazione di 10^5 batteri/mL di urine e di resistere ai meccanismi di difesa dell'ospite, come il flusso dell'urina o lo svuotamento della vescica urinaria.

In ambito ambulatoriale, le UTIs sono per frequenza seconde solo a quelle a carico delle alte vie respiratorie e rappresentano mediamente il 20% della patologia nefrourologica; in ambiente ospedaliero rappresentano la prima causa di infezione acquisita (circa il 40%).

A livello clinico le UTIs possono essere classificate in base:

- alla sintomatologia;
- alla sede (alte o basse vie urinarie);
- all'andamento clinico e temporale (acuta o cronica, ricorrente);
- alla gravità (complicata o non complicata);
- a criteri anatomo-patologici.

Se si prende in considerazione la sede, si distinguono in:

- infezioni delle basse vie urinarie (cistiti, uretriti e prostatiti);
- infezioni delle alte vie urinarie (pieliti e pielonefriti).

Le forme più comuni sono le cistiti, che si presentano come un'inflammazione vescicale spesso associata ad uretrite. Queste patologie possono essere distinte in:

- acute, prevalentemente ad eziologia batterica;
- croniche, indotte da micobatteri e parassiti;
- ricorrenti, se si presentano episodi recidivanti dopo l'interruzione della terapia antibiotica [3].

L'incidenza di UTIs varia in relazione al sesso: nelle donne la frequenza di contrarre una UTI (1,2%) è il doppio rispetto all'uomo (0,6%). È stato stimato che almeno una donna su tre, prima dei 24 anni, manifesti un caso di UTI diagnosticato e curato con profilassi antibatterica; il 40%-50% delle donne manifesterà almeno una volta nella sua vita questa patologia.

Tra i fattori predisponenti all'insorgenza di UTIs, oltre a quelli biologici, che includono le anomalie congenite, le ostruzioni del flusso urinario, le precedenti infezioni, vanno considerati anche quelli di tipo comportamentale, che comprendono la frequenza dei rapporti sessuali, l'utilizzo del diaframma, di preservativi o spermicidi per la contraccezione.

Nell'ambito delle infezioni urinarie, vanno considerate quelle ricorrenti (rUTIs), sindromi molto comuni nelle giovani donne, che non presentano alcuna anomalia anatomo-funzionale del tratto urinario; l'incidenza di tali infezioni è di circa il 40% nelle donne che abbiano manifestato un'infezione del tratto urinario nel corso della vita. Nella maggior parte dei casi la ricorrenza di cistiti è data da una re-infezione

dello stesso ceppo che aveva inizialmente causato la malattia, persistendo nella flora fecale e ricolonizzando successivamente il tratto urinario. La maggiore propensione di alcuni soggetti a contrarre UTIs ricorrenti sembrerebbe influenzata dal fatto che i coliformi uropatogenici sono in grado di aderire meglio alle cellule uroepiteliali rispetto ad un soggetto normale. Questo risulta un fenomeno geneticamente determinato [4].

Alcune categorie si dimostrano maggiormente suscettibili alle UTIs rispetto ad altre: ne sono un esempio i bambini, le donne incinte, gli anziani, i diabetici, i pazienti con Spinal Cord Injury, con sclerosi multipla o con immunodeficienze [5].

1.2 Eziologia

Gli agenti eziologici responsabili di UTIs vengono distinti tra quelli che le provocano in ambiente comunitario e quelli acquisiti in ambiente ospedaliero. I primi comprendono *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, causa di infezioni soprattutto nelle giovani donne sessualmente attive, e con minor frequenza *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*. Quest'ultimo è spesso associato alla presenza di calcoli urinari, probabilmente per il fatto che produce una potente ureasi, che scinde l'urea producendo ammoniaca, rendendo così le urine alcaline. In generale, in ambiente extraospedaliero, la maggior parte delle UTIs è sostenuta da batteri Gram-negativi di provenienza intestinale endogena, quali *E. coli* (75-90% dei casi), e da altre Enterobacteriacee. Negli ultimi anni si è notato un incremento delle UTIs sostenute da batteri Gram-positivi, in particolare *S.*

saprophyticus, che è secondo ad *E. coli* nel provocare cistiti nelle giovani donne. Tra i patogeni responsabili delle infezioni ospedaliere rientrano batteri Gram-positivi, quali *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*; batteri Gram-negativi come *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*.

Anche in ambiente ospedaliero, prevalentemente a causa delle manovre strumentali invasive, come la cateterizzazione, prevalgono le infezioni causate da Gram-negativi, ma solo il 50% è sostenuto da *E. coli*; tra i Gram-positivi è in aumento l'incidenza da *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. epidermidis* e, in minor misura, da *S. aureus*.

Le infezioni delle vie urinarie possono essere causate anche da miceti e nella maggior parte dei casi si riscontrano lieviti del genere *Candida*, in particolar modo *Candida albicans*. La presenza di miceti nelle urine non sempre è indice di infezione e a volte si tratta di una semplice colonizzazione dovuta al dismicrobismo da antibiotici.

In seguito ad una diffusione ematogena al tratto urinario, possono essere riscontrate altre specie, come ad esempio *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (responsabile della tubercolosi renale).

Raramente le infezioni del tratto urinario sono causate da virus, anche se talvolta sono associate a cistite emorragica e ad altre sindromi renali, come nel caso di alcuni sierotipi di adenovirus.

Spesso, causa di UTIs possono essere anche specie eucariotiche, come *Histoplasma capsulatum*, *Trichomonas vaginalis*, frequente causa di vaginite nelle donne e di

uretrite negli uomini, *Schistosoma haematobium*, che causa infiammazione della vescica ed ematuria [6], [7].

1.3 Patogenesi delle infezioni del tratto urinario

In generale, le infezioni del tratto urinario inferiore sono spesso accompagnate da una leggera febbre (inferiore ai 38°C), brividi e sensazione di malessere.

Le cistiti acute sono limitate alla vescica e caratterizzate da sintomi come disuria, frequenza della minzione e dolore soprapubico; la batteriuria può essere anche asintomatica [8].

Nelle infezioni del tratto urinario superiore, invece, i sintomi più frequenti sono caratterizzati da una temperatura corporea superiore ai 38°C, associata a brividi, nausea, vomito e dolore lombare.

Le vie attraverso cui i microrganismi possono raggiungere l'uroepitelio sono varie:

- via canalicolare o ascendente, per risalita di batteri di derivazione fecale lungo l'uretra, i tessuti periuretrali e nella donna, dal vestibolo vaginale e dal perineo sino alla vescica;
- via ematogena: per batteriemia da *Staphylococcus aureus* da focolai orali, funginemia da *Candida spp.* in affezioni croniche renali (nefroangiosclerosi, rene policistico, amiloidosi renale, idronefrosi);
- via linfatica: in gravi infezioni intestinali (ascesso appendicolare, diverticolite del colon, ileite terminale).

Alterazioni anatomo-funzionali che determinano una ostruzione del flusso urinario (ipertrofia prostatica, calcoli renali, tumori e stenosi) o l'urina residua nella vescica possono facilitare l'ingresso dei patogeni nelle vie urinarie.

L'incidenza delle UTIs è più elevata tra le donne per diversi fattori, quali la brevità dell'uretra e la presenza di un maggior numero di microrganismi nel tratto uretrale femminile, dovuto all'habitat batterico vaginale.

In seguito ad una ostruzione del tratto urinario può determinarsi un'infezione di tipo ascendente, in grado di raggiungere il tessuto renale e provocare danni di diversa entità.

Il reflusso vescico-uretrale (reflusso di urine dalla vescica verso gli ureteri, alcune volte nella pelvi o nel parenchima renale) è frequente nei bambini con anomalie anatomiche del tratto urinario e può predisporre ad infezioni ascendenti e a danno renale. Gli individui con diabete mellito presentano infezioni più gravi e se la neuropatia diabetica interferisce con la normale funzione della vescica sono più frequenti infezioni persistenti del tratto urinario.

Anche la cateterizzazione può predisporre all'insorgenza di UTIs, in quanto il catetere altera la normale funzione protettiva della vescica e fa sì che i batteri possano essere trasportati direttamente in vescica.

1.4 *Escherichia coli* ed urotelio: esempio evolutivo di interazione ospite-parassita

Attraverso un'ampia varietà di meccanismi di adesione, i batteri sono in grado di localizzarsi su specifici siti sulle cellule ospiti e iniziare il processo infettivo. Più dell'85% delle infezioni urinarie è infatti causata da *Escherichia coli*, germe in grado di superare le difese della vescica e stabilirsi all'interno delle cellule uroteliali. Riteniamo verosimile teorizzare che in risposta ad una spinta evolutiva tessuto uroteliale e parassita si siano adattati il primo per rispondere agli attacchi del secondo e questo per affinare meccanismi di adesione ed invasione cellulare. L'adesione, infatti, è il primo step nel processo infettivo ed è determinato da un'intima interazione tra fattori di virulenza e tessuto. Tale interazione non è solo confinata alla superficie, ma consente al batterio di avviare un processo cellulare che lo porta a penetrare e sopravvivere all'interno delle cellule uroteliali, colonizzandole e dando inizio a eventi critici nello sviluppo dell'infezione, e, nello stesso tempo, permette all'urotelio di mettere in atto i principali meccanismi di difesa contro l'attacco microbico.

Il termine urotelio indica l'epitelio di rivestimento della via escrettrice urinaria, che si estende dai calici renali all'uretra [9]. In base al cambiamento di volume degli organi cavi che tappezza, può essere soggetto a modificazioni: nella vescica, infatti, dovendo questa struttura contenere volumi variabili di liquido, il suo aspetto morfologico si modifica in base al grado di distensione dell'organo [3]. La principale funzione dell'urotelio è quella di ritenere le urine e di prevenire la perdita di soluti e ioni.

L'urotelio consiste di almeno tre strati:

- ✓ strato basale, costituito da cellule di aspetto cubico-cilindrico, adese alla membrana basale;
- ✓ strato intermedio, costituito da due o più ordini di cellule che, per la loro forma sono dette clavate o piriformi. Queste cellule inviano i loro prolungamenti tra le cellule dello strato profondo;
- ✓ strato superficiale, rappresentato da cellule molto grandi (diametro di 25-250µm) ed espanse, spesso binucleate e a forma di cupola (cellule cupoliformi o "a ombrello"). Le cellule a ombrello sono interconnesse da giunzioni strette e sono ricoperte sulla superficie apicale da proteine che prendono il nome di uroplachine.

Una serie di strutture e molecole caratteristiche delle cellule a ombrello conferiscono all'urotelio la sua classica funzione di barriera:

- ✓ molecole lipidiche specializzate;
- ✓ le giunzioni strette, che riducono il movimento degli ioni e dei soluti tra le cellule;
- ✓ le uroplachine sulla superficie apicale, che riducono la permeabilità delle cellule a piccole molecole (acqua, urea, protoni).

La superficie apicale dell'urotelio è inoltre rivestita di uno strato glicosaminoglicanico che si pensa agisca come fattore antiaderente e come meccanismo di difesa dalle infezioni [9].

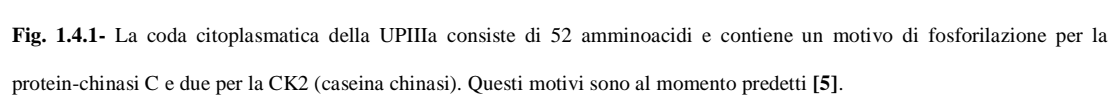
1.4.1 Le uroplachine

L'urotelio necessita di un'alta flessibilità durante il ciclo della minzione, in maniera tale che esso possa essere soggetto a notevoli cambiamenti nella superficie. Questa caratteristica risiede nella specializzazione delle cellule a ombrello, caratterizzate da una membrana plasmatica apicale altamente specializzata, denominata "unità di membrana asimmetrica" (AUM), che riveste un ruolo determinante nel mantenimento dell'impermeabilità del tessuto a composti tossici presenti nell'urina.

Questa struttura unica comprende quattro proteine transmembrana, le uroplachine (Ups) Ia (27 KDa), la Ib (28 kDa), la II (15 kDa) e la IIIa (47 kDa), che, interagendo reciprocamente tra di loro, si aggregano in cristalli bidimensionali esagonali costituiti da particelle di 16nm, conosciuti come "placche uroteliali", di forma concava e rigide, visibili solo con il microscopio elettronico, che coprono più del 90% della superficie apicale delle cellule a ombrello e a cui si legano specifiche proteine citoplasmatiche; la loro espressione risulta ridotta negli strati cellulari intermedi [10]. Dai risultati di studi morfologici e fisiologici, si è visto che la formazione di queste placche fornisce forza e flessibilità alla superficie luminale della vescica, costituendo una barriera impermeabile che previene l'invasione dell'urina nei tessuti circostanti.

Le uroplachine sono state inizialmente identificate nell'urotelio bovino e risultano altamente conservate negli uroteli dei mammiferi; tuttavia, i loro pesi molecolari variano leggermente da specie a specie. La conservazione delle sequenze amminoacidiche delle uroplachine suggerisce come esse giochino un ruolo importante nell'epitelio urinario.

A livello di struttura primaria le UPIa e Ib sono identiche per circa il 40%.



Le UpIa e UpIb vanno obbligatoriamente incontro a eterodimerizzazione rispettivamente con le UpII e UpIII [10], [11] (**Fig. 1.4.2**) durante il trasporto dal reticolo endoplasmatico (RE) alla superficie cellulare apicale e gli eterodimeri risultanti si assemblano in complessi altamente ordinati, contribuendo al controllo della permeabilità della vescica.

Dopo la sintesi nell'ER, le UPs si caricano di glicani contenenti mannosio e si assemblano in eterodimeri. I glicani su due dei tre siti N-glicosilati sul pro-peptide dell'UPII diventano complessi nell'apparato di Golgi, causando cambiamenti conformazionali nella pro-UPII e nel suo partner UPIa e consentendo la formazione dell'eterotetramero. Se non avviene la conversione di due dei tre glicani sulla UPII in glicani complessi il processo di formazione delle particelle di 16nm si arresta [12].

Mentre la UpII e la UpIIIa sono trasportate sulla membrana plasmatica solo dopo eterodimerizzazione con le loro controparti, la UpIb, quando espressa da sola, può uscire dal reticolo endoplasmatico e muoversi verso la membrana, al contrario della UpIa, che rimane compartimentalizzata. Ciò potrebbe spiegare perché la UpIb è l'unica uroplachina che è espressa anche in altri tessuti e organi, come la cornea, la congiuntiva e il polmone.

Il ruolo della UP1b è essenziale per quanto riguarda l'assemblaggio delle placche uroteliali, soprattutto nelle fasi di maturazione dell'urotelio e ciò suggerisce un suo ruolo chiave nel guidare gli stadi finali di differenziamento uroteliale.

Le placche non si trovano unicamente sulla superficie luminale, ma sono presenti in abbondanza anche in vescicole fusiformi nel citoplasma delle cellule a ombrello, marcate positivamente per la GTPasi Rab27b (**Fig. 1.4.3**).

Queste vescicole citoplasmatiche viaggiano reversibilmente tra la membrana apicale e il citoplasma per regolare la superficie luminale durante i cicli uroteliali di contrazione/estensione (**Fig. 1.4.4**) [13].

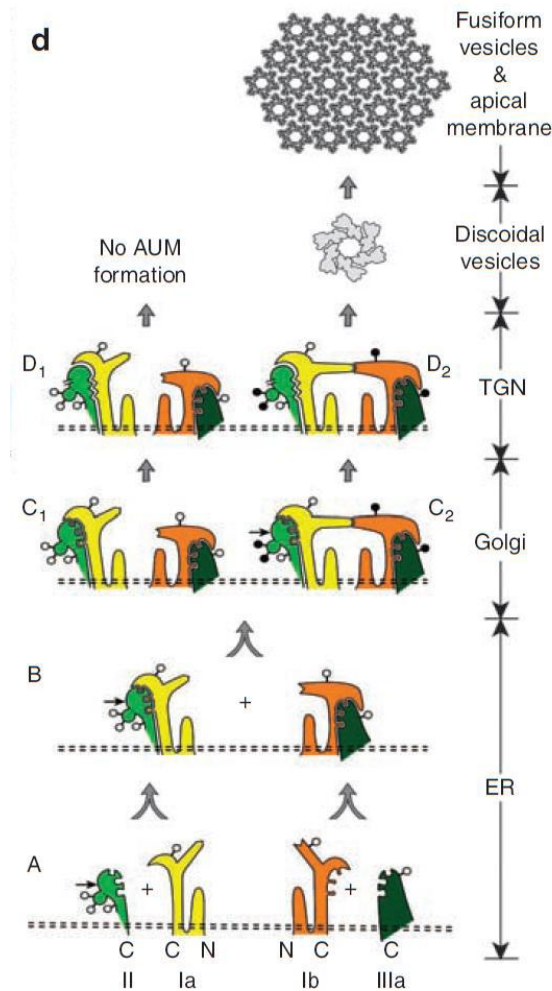


Fig. 1.4.2- Illustrazione di un modello che mostra l'assemblaggio delle quattro maggiori uroplachine in cristalli bidimensionali. A e B: le UP acquisiscono glicani, contenenti mannosio, nel RE e si organizzano a formare gli eterodimeri (UPIa/II e UPIb/IIIa) che subiscono cambiamenti conformazionali. La freccia orizzontale sulla UPII indica il sito di clivaggio per la furina. I cerchi vuoti e pieni rappresentano glicani con mannosio o complessi, rispettivamente [13].

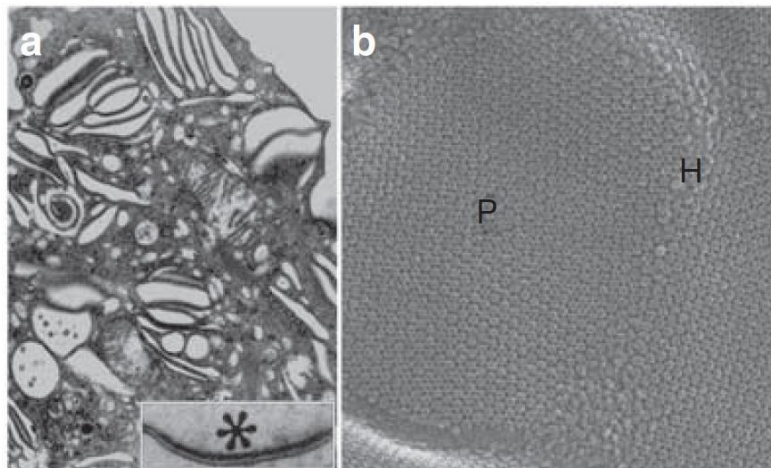


Fig. 1.4.3- (a) Micrografia TEM delle cellule a ombrello della superficie uroteliale di topo. Sono visibili gli addensamenti delle vescicole fusiformi appiattite, la maggior parte delle quali matura da vescicole sferiche presenti in profondità nel citoplasma. L'ingrandimento laterale mostra la placca rigida e rende visibile la AUM. (b) Con la tecnica quick-freeze/deep-etch è visibile la superficie apicale delle cellule a ombrello che mostra le placche uroteliali (P), che contengono le particelle ordinate di 16nm, interconnesse da aree cerniera (H) [13].

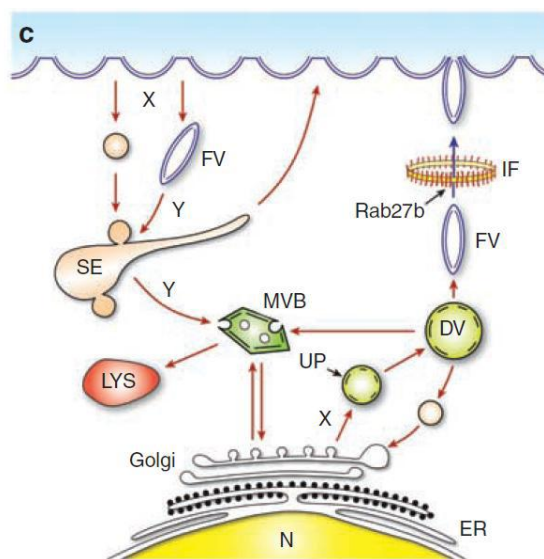


Fig. 1.4.4- Illustrazione del traffico vescicolare nelle cellule a ombrello. Gli eterodimeri assemblati nell'ER e modificati nell'apparato di Golgi si accumulano e lasciano l'apparato sottoforma di vescicole discoidali (DV). Le vescicole fusiformi mature (FV) attraversano una rete di filamenti intermedi citoscheletrici e si fondono con la membrana plasmatica apicale in un processo mediato da Rab27b. La degradazione delle uroplachine richiede la formazione di vescicole endocitiche e/o la modificazione delle FV che formano endosomi di smistamento e corpi multivesicolari (MBV), che si fondono con lisosomi (LYS) maturi [13].

La UPIb potrebbe servire come recettore alternativo per batteri dotati di fimbrie di tipo I in cellule uroteliali in coltura [5].

La UPIa è quella che espone la maggiore quantità di glicani mannosilati [14], mentre le UPIb e UPIIIa portano principalmente zuccheri complessi [14], [15], [16]. Inoltre, poichè i tre siti N-glicosilati che espone la pro-UPII vengono processati proteoliticamente e non sono presenti nella proteina matura, è improbabile che questa agisca come recettore per gli UPEC.

1.5 Strategie microbiche per l'interazione con l'urotelio e meccanismi di difesa dell'ospite

La capacità di causare infezioni del tratto urinario è limitata ad alcuni sierogruppi di *E. coli*, come i sierotipi O (somatici) e K (capsulari), che differiscono da quelli associati alle infezioni del tratto gastrointestinale e che vengono definiti con il termine di *E. coli* uropatogeni (UPEC).

I meccanismi di difesa messi in atto dal tratto urinario, un ambiente tipicamente sterile, sono molteplici:

- il flusso dell'urina, che consente di allontanare i microbi adesi debolmente alla superficie della vescica [17];
- il basso pH e l'osmolarità dell'urina, che possono inibire la crescita batterica;
- i sali, l'urea e gli acidi organici presenti nell'urina che contribuiscono a ridurre la sopravvivenza batterica nel tratto urinario;

- la lattoferrina, presente nelle urine, che lega il ferro, elemento essenziale per la crescita di alcuni microrganismi;
- la proteina di Tamm-Horsfall, zuccheri a basso peso molecolare, IgA secretorie, che comportandosi come fattori anti-adesione, possono determinare l'inibizione competitiva dell'adesione batterica alla superficie vescicale.

Quando un patogeno riesce a superare queste difese costitutive e prende contatto con l'urotelio, la sua continua presenza può innescare la comparsa di infezioni a carico del tratto urinario.

L'attacco di specie di *E.coli* uropatogeni (UPEC) alle cellule epiteliali o a componenti mucosali secrete dalle cellule ospiti è regolato da specifiche interazioni tra componenti batteriche di superficie (adesine) e i recettori della cellula ospite.

Le adesine possono trovarsi sia su organelli superficiali filamentosi (pili o fimbrie) che sulla membrana esterna del batterio.

Quelle associate alle fimbrie sono lectine (proteine leganti carboidrati) che riconoscono una varietà di glicoconjugati della cellula ospite. Le lectine associate alle fimbrie P riconoscono epitopi all'interno della globoserie dei glicolipidi, quelle associate alle fimbrie S riconoscono glicoconjugati con residui di acido sialico ed infine quelle sulle fimbrie di tipo I legano residui di mannosio presenti a livello di recettori proteici sulle cellule ospiti [8].

Oltre alle fimbrie, gli UPEC si avvalgono di una serie di altri fattori di virulenza per colonizzare l'ospite, come: l'emolisina α , che ha attività citotossica sia sulle cellule epiteliali che sui fagociti e linfociti, il fattore necrotizzante CNF1, che causa la formazione di cellule giganti multinucleate per un'azione sui microfilamenti delle

cellule eucariotiche, la capsula polisaccaridica e la presenza sulla membrana batterica di proteine ad attività anti-complementare e anti-fagocitaria [18].

La maggior parte dei germi isolati da pazienti con UTIs codificano per il pilo di tipo 1, organello filamentoso di superficie, lungo 1-2 μ m. Questo organello consiste di un'asta elicoidale spessa 7nm costituita da subunità di FimA ripetute che si uniscono a un cappuccio fibrillare di 3nm contenente due proteine adattatrici, FimF e FimG, e l'adesina FimH [19].

L'adesina FimH consiste di due domini (**Fig. 1.5.1**):

- ✓ un dominio specifico per il pilo, COOH-terminale, coinvolto nell'incorporazione di FimH nel pilo di tipo 1;
- ✓ un dominio adesinico, NH-terminale, che contiene una tasca di legame per i carboidrati, che è in grado di accogliere residui di D-mannosio [18].

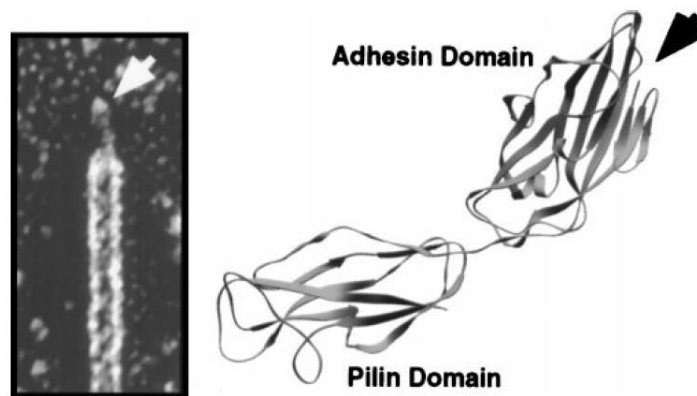


Fig. 1.5.1- Architettura del pilo di tipo 1 e struttura cristallizzata dell'adesina FimH. A sinistra è visibile una immagine al ME ad alta risoluzione che rivela la struttura composta del pilo di tipo 1. La freccia indica l'adesina FimH, situata all'estremità del pilo. A destra è visibile la struttura proteica di FimH. Questa consiste di due domini con ripiegamento a tipo Ig. Il dominio adesinico ha una tasca di legame che può ospitare il D-mannosio[18].

FimH si lega a recettori glicoproteici contenenti mannosio e può mediare l'adesione del batterio ad una ampia varietà di cellule dell'ospite [19], comprese quelle dell'urotelio.

Questo legame, oltre a consentire al batterio di avere un appiglio sulla superficie uroteliale, innesca le risposte della cellula ospite, determina l'attivazione di una serie di chinasi e il reclutamento di proteine adattatrici, che culminano con la riorganizzazione del citoscheletro actinico e l'ingresso del batterio al suo interno. Il patogeno può così propagarsi o persistere in uno stato di quiescenza nella cellula ospite, fornendo, quindi, un possibile serbatoio di batteri responsabili del manifestarsi delle infezioni ricorrenti [20].

In aggiunta alla sua funzione di componente della AUM, la UPIa gioca un ruolo importante nella patogenesi delle infezioni del tratto urinario, in quanto è in grado di comportarsi come recettore per FimH di ceppi di *E. coli* uropatogeni [20], [21], con conseguente rapida apoptosi uroteliale e invasione delle cellule uroteliali da parte degli UPEC. In seguito a tale legame i batteri invadono e si replicano all'interno del citoplasma di tali cellule, formando delle vere e proprie comunità batteriche intracellulari (IBCs). Tale abilità rappresenta un evento cruciale nel determinismo delle UTIs ed è alla base del frequente fallimento delle terapie convenzionali, con conseguente aumento del fenomeno dell'antibiotico-resistenza [22].

Successivamente i batteri possono fuoriuscire dalle loro nicchie adottando una morfologia filamentosa e poi aderire nuovamente ad altre cellule ospiti, generando una reinfezione. Durante il processo infettivo le cellule infettate possono andare incontro ad un processo esfoliativo, con perdita nelle urine e reclutamento di neutrofili nel sito d'infezione.

In risposta all'adesione degli *E. coli* con pili di tipo 1 l'ospite mette in atto un meccanismo di difesa aggiuntivo consistente nell'esfoliazione delle cellule epiteliali infettate e danneggiate della vescica.

Infatti, sebbene le cellule epiteliali che rivestono la superficie luminale della vescica abbiano un turnover molto lento (le cellule dello strato basale dell'urotelio, che si ritiene siano i precursori degli altri tipi cellulari sovrastanti, normalmente esibiscono un turnover di 3-6 mesi), nelle urine di pazienti con UTIs si riscontrano, invece, cellule vescicali esfoliate contenenti batteri (**Fig. 1.5.2**).

L'esfoliazione è un meccanismo apoptotico che comporta la frammentazione del DNA dell'ospite e l'attivazione di una serie di proteasi cisteiniche, le caspasi (**Fig. 1.5.3**) [18].

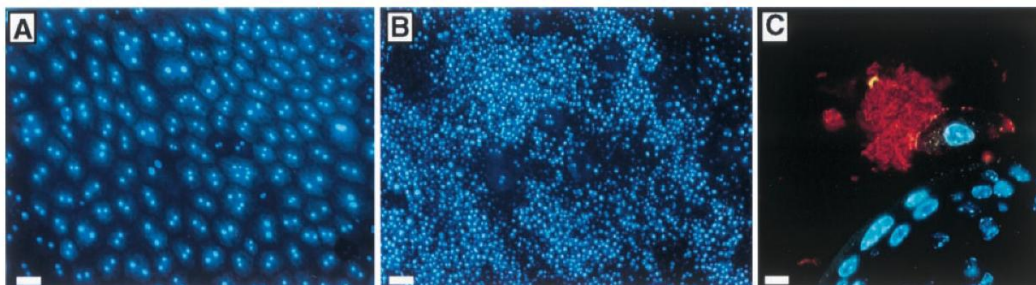


Fig. 1.5.2- Esfoliazione delle cellule epiteliali di vescica. (A) La superficie luminale della vescica è costituita da cellule altamente differenziate con contorni pentagonali o esagonali caratteristici. Queste grandi cellule sono spesso bi- o multi-nucleate e possono essere facilmente identificate. (B) Entro 6h dall'inoculo con *E.coli* fimbriato (pili di tipo1), alcune cellule esfoliano ed è possibile osservare le cellule piccole e mono-nucleate sottostanti. (C) Una sezione in paraffina di una vescica di topo infettata mostra una cellula a ombrello nel processo di esfoliazione, che porta con se il batterio ad essa aderente. Le cellule ospiti sono state colorate con colorante Hoechst, mentre i batteri (in rosso) sono stati colorati usando un anticorpo secondario marcato con Cy3. La barra corrisponde a 100µm (in A e B) e 10µm (in C) [18].

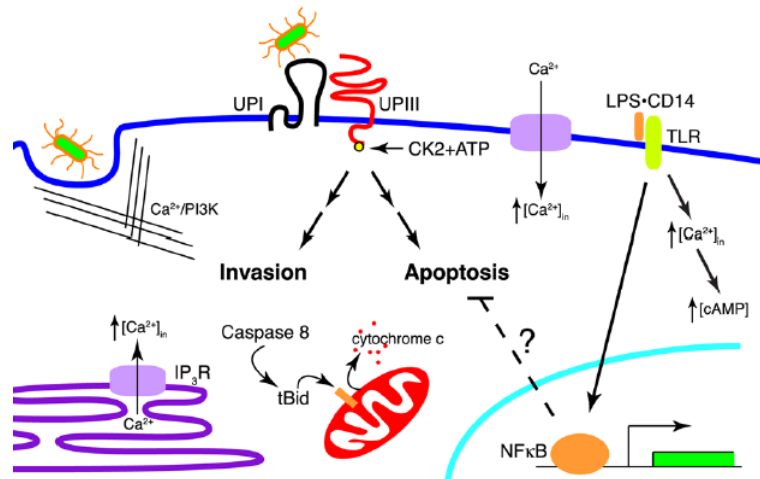


Fig. 1.5.3- Modello del meccanismo apoptotico mediato dalle Ups in seguito ad infezione da UPEC [5].

A seguito della massiccia esfoliazione, a livello della vescica è possibile notare anche un infiltrato di neutrofili, caratteristico delle UTIs, che entrano nell'urotelio e nel lume vescicale. L'infezione batterica induce l'espressione di ICAM-1 a livello epiteliale, che va ad interagire con il recettore CD11b/CD18 dei neutrofili, permettendo la loro migrazione nell'urotelio.

Anche la produzione di fattori antimicrobici come l'ossido nitrico e le defensine da parte delle cellule uroteliali e l'attivazione delle cellule immunitarie, come i mastociti e i macrofagi, aiutano a controllare le UTIs.

Inoltre, i batteri stimolano le cellule epiteliali a produrre citochine e altri fattori pro-infiammatori. La produzione sistemica di citochine, come l'interleuchina 6 (IL-6) determina febbre e porta all'attivazione delle risposte di fase acuta.

Le citochine importanti per l'attività chemiotattica, in particolare l'interleuchina 8 (IL-8) reclutano i granulociti polimorfonucleati (PMNs) sulla superficie mucosale [8].

Per quanto riguarda l'immunità umorale, oltre alla normale produzione di tutte le classi anticorpali (IgA, IgG, IgM, IgD, IgE), nella risposta alle infezioni urinarie particolare importanza è attribuita alla produzione di IgA secretorie (IgAs), rilasciate localmente a livello della mucosa.

La presenza di questo tipo di anticorpi interferisce con l'adesione batterica alle cellule epiteliali (**Fig. 1.5.4**), [12].

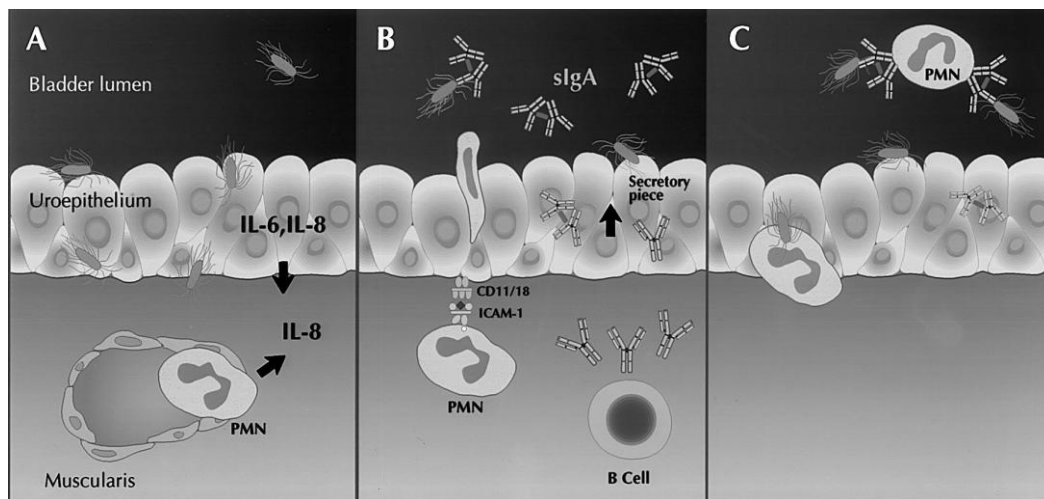


Figura 1.5.4- Risposta immunitaria all'ingresso degli uropatogeni all'interno della vescica. (A) I microrganismi patogeni invadono l'epitelio vescicale provocando il rilascio di citochine (IL-6 e IL-8) da parte delle cellule epiteliali e dai leucociti che hanno raggiunto il sito d'infezione. (B) I leucociti polimorfonucleati (PMNs) attraversano lo strato epiteliale grazie all'interazione di specifici recettori (CD11/CD18) e molecole di adesione intracellulare (ICAM-1); i linfociti B secernono IgA. (C) Le IgA inibiscono il legame dei batteri all'uroepitelio, che sono fagocitati e distrutti dai PMNs [12].

Per la UPIIIa è stato proposto un ruolo, finora mai descritto, nei processi di invasività batterica e apoptosi. Infatti, in risposta al legame della UPIa alle adesine dei batteri fimbriati, la coda citoplasmatica dell'UPIIIa va incontro a fosforilazione su uno specifico residuo di treonina, indotta dalla caseina chinasi II, seguita da un incremento del calcio intracellulare, associato al reclutamento di altre molecole

segnale. Ciò determina l'attivazione di elementi citoscheletrici della cellula ospite e l'endocitosi del batterio uropatogeno. Inoltre, la fosforilazione della UPIIIa è in grado di attivare intermedi di segnalazione non noti, che danno inizio a cascate apoptotiche intrinseche ed estrinseche.

L'inibizione farmacologica di questi eventi segnale abroga l'invasione batterica e l'apoptosi uroteliale sia *in vitro* che *in vivo*[5].

Recentemente è stato dimostrato che il Toll like receptor 4 (TLR4) è coinvolto nell'espulsione degli *E. coli* uropatogeni dalle cellule uroteliali infette attraverso aumento dei livelli di AMP ciclico (cAMP). Il riconoscimento dell'LPS da parte del TLR4 attiva un pathway di segnalazione dipendente dalla adenilil ciclasi 3 (AC3), dal cAMP e dalla protein chinasi A (PKA), in grado di regolare l'espulsione dei batteri dalle cellule epiteliali di vescica (BECs). Tale via di segnalazione coinvolge anche la caveolina-1, Rab27b, la myosin-VIIa- and Rab-interacting protein (MyRIP), anch'esse determinanti nell'assemblaggio del complesso proteico responsabile dell'esocitosi della vescicola fusiforme contenente il batterio (**Fig. 1.5.5**) [23],[24].

Il TLR4 è presente sulla superficie delle cellule uroteliali, riconosce il lipopolisaccaride dei batteri GRAM- e attiva una sequenza di segnali intracellulari, che portano all'attivazione di NF-kB e citochine NF-kB dipendenti, coinvolte nel reclutamento dei fagociti.

Recenti dati suggeriscono che il trattamento delle cellule epiteliali di vescica con LPS solubile mostra un'aumentata espulsione degli *E. coli* internalizzati, rispetto alle BECs non trattate; allo stesso modo, la ridotta espressione del TLR4 nelle BECs riduce in maniera marcata l'esocitosi degli *E. coli* uropatogeni rispetto ai controlli [23].

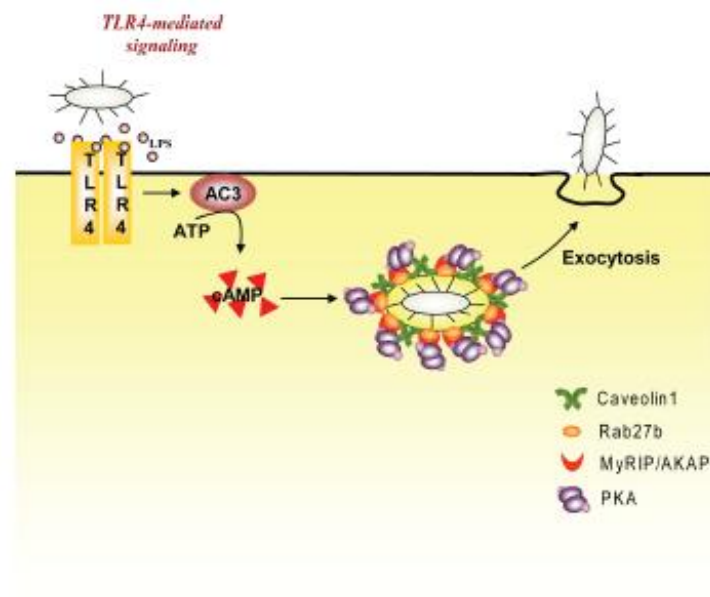


Fig. 1.5.5- Meccanismo di esocitosi batterica cAMP dipendente dalle BECs mediata dal TLR4 [23].

Nonostante questi numerosi meccanismi di difesa, un significativo numero di batteri può persistere nella vescica per giorni o settimane [18].

1.6 Rapporto urotelio-sistema nervoso e agente infettante: un triangolo tutto da scoprire

La funzione di barriera dell'urotelio può talvolta venire compromessa, come nel caso di traumi meccanici o chimici o infezioni batteriche. Ciò può determinare, il passaggio di acqua, urea e sostanze tossiche nei tessuti sottostanti e spesso cambiamenti ultrastrutturali ed alterazioni nei livelli di alcuni mediatori chimici, come l'ossido nitrico (NO) e l'ATP. Inoltre, la distruzione dell'integrità della barriera uroteliale è stata correlata all'espressione di fattori antiproliferativi che

possono inibire la proliferazione epiteliale, andando ulteriormente a compromettere la funzione di barriera dell'epitelio.

La normale funzione della vescica è sotto il controllo del sistema nervoso centrale, simpatico, parasimpatico e dei nervi somatici che innervano il muscolo detrusore.

Molte patologie neurodegenerative sia di natura traumatica (come nel caso di incidenti stradali o sul lavoro, cadute accidentali o lesioni da sport) che di pertinenza medica (come malattie di tipo acuto, quali le mieliti, o cronico, come la sclerosi multipla) possono provocare un'alterazione nell'innervazione della vescica con conseguente disfunzione del tratto urinario inferiore (NLUTD).

Una lesione midollare si verifica quando si interrompe, parzialmente o totalmente, la connessione funzionale tra i centri superiori del sistema nervoso centrale ed i nervi periferici a livello del midollo.

I sintomi minzionali sono generalmente rappresentati da: urgenza minzionale, pollachiuria, incontinenza urinaria, disuria o ritenzione urinaria. Inoltre, il continuo ristagno di urine nella vescica espone tali soggetti ad un alto rischio di sviluppo di infezioni ricorrenti del tratto urinario, spesso alla base di complicanze più serie, come la compromissione della funzionalità renale.

L'alterazione dei normali meccanismi di regolazione vescico-sfinterici da patologia neurologica documentata prende il nome di vescica neurologica.

Tali danni assumono diversi gradi di severità a seconda che la lesione neurologica sia completa o incompleta ed in base al livello in cui si verifica (**Fig. 1.6.1**), [25].

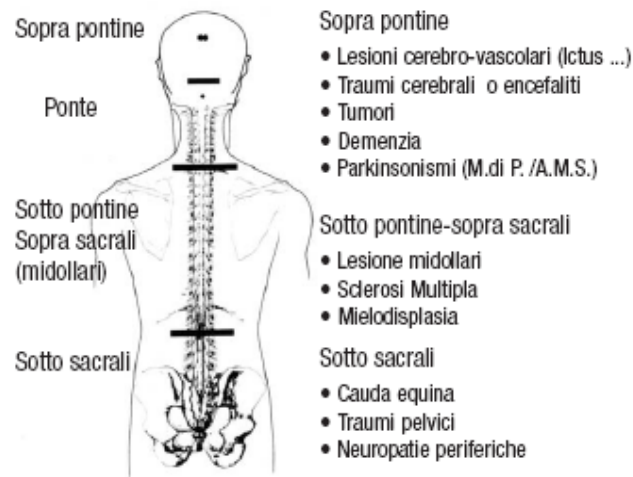


Fig. 1.6.1- Localizzazione delle principali patologie neurologiche causa di vescica neurologica [25].

Alla discinesia vescicale conseguente a questa condizione patologica è stata da sempre associata la maggiore suscettibilità dei pazienti affetti alle infezioni del tratto urinario. Il ristagno vescicale non è, però, il solo fattore cruciale per la vescica neurologica.

Infatti, la comunicazione chimica tra il sistema nervoso e le cellule uroteliali ha un ruolo importante nella generazione di disfunzioni urinarie della vescica. Ad esempio, la resezione della colonna spinale (spinal-cord) nei ratti porta ad una rapida alterazione della barriera uroteliale che comprende cambiamenti ultrastrutturali a carico degli strati superficiale, intermedio e basale dell'urotelio e conseguenti modifiche nella permeabilità [26].

2. SCOPO DELLO STUDIO

Per quanto concerne le infezioni delle basse vie urinarie, le cistiti sono sicuramente le forme più comuni e spesso possono dare origine a fenomeni recidivanti.

In questo contesto, il nostro interesse è stato rivolto alla interazione microbo-urotelio, momento fondamentale per l'inizio del processo infettivo, tanto nelle infezioni acute quanto in quelle cronico-recidivanti. In tale ambito, oltre ad approfondire la struttura molecolare dell'urotelio in condizioni normali, abbiamo esteso la nostra area di indagine alle infezioni urinarie secondarie a patologie neurodegenerative, caratterizzate da un'alterazione dei normali meccanismi di regolazione vescico-sfinterici.

Alla discinesia vescicale conseguente a questa condizione patologica, nota come vescica neurologica, è stata da sempre associata la maggiore suscettibilità dei pazienti affetti alle infezioni del tratto urinario. Tuttavia, numerose evidenze scientifiche supportano l'idea che i cambiamenti morfo-fisiologici dell'urotelio secondari a traumi midollari, caratterizzati da perdita superficiale delle cellule a ombrello e rapido differenziamento delle cellule dello strato intermedio [26], possano determinare la maggiore predisposizione alle UTIs.

A tal fine, la linea di ricerca seguita ha previsto lo studio, in modelli murini di neurodegenerazione di natura traumatica (SCI), dell'espressione di markers di differenziamento uroteliale e dei principali componenti delle placche uroteliali.

Sebbene la principale funzione dell'uroepitelio sia quella di barriera di permeabilità, in grado di ritenere le urine e prevenire la perdita di soluti e ioni, sempre di più viene riconosciuta la sua capacità di ricevere stimoli chimici e fisiologici e di rilasciare un

numero elevato di molecole segnale. In aggiunta, molti dati in letteratura supportano l'esistenza di una mutua comunicazione tra il sistema nervoso e l'urotelio: la vescica è innervata da molti tipi di nervi afferenti, alcuni dei quali sono localizzati negli strati muscolari e altri subito al di sotto o all'interno dell'urotelio.

Le cellule uroteliali, infatti, esprimono numerosi recettori e canali ionici: sono stati identificati i recettori per le purine, l'acetilcolina, la norepinefrina ed un numero svariato di altri recettori, che lo rendono capace di rispondere a molteplici stimoli [27].

Le terminazioni dei nervi afferenti associati all'epitelio sono altamente sensibili a segnali chimici rilasciati dalle cellule uroteliali, come l'ossido nitrico (NO), prostaglandine, ATP, acetilcolina, adenosina, citochine, prostanoidei, sostanza P, etc. Allo stesso modo, le cellule uroteliali rispondono a molte molecole chimiche o neurotrasmettitori, inclusi acetilcolina, norepinefrina, ATP, calcitonina, etc [28].

Ciononostante, i meccanismi molecolari alla base della funzione recettoriale dell'urotelio non sono ancora del tutto chiariti.

L' L-Glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi ed agisce attraverso l'attivazione di due famiglie di recettori: ionotropici e metabotropici (**Fig 2.1**),[29].

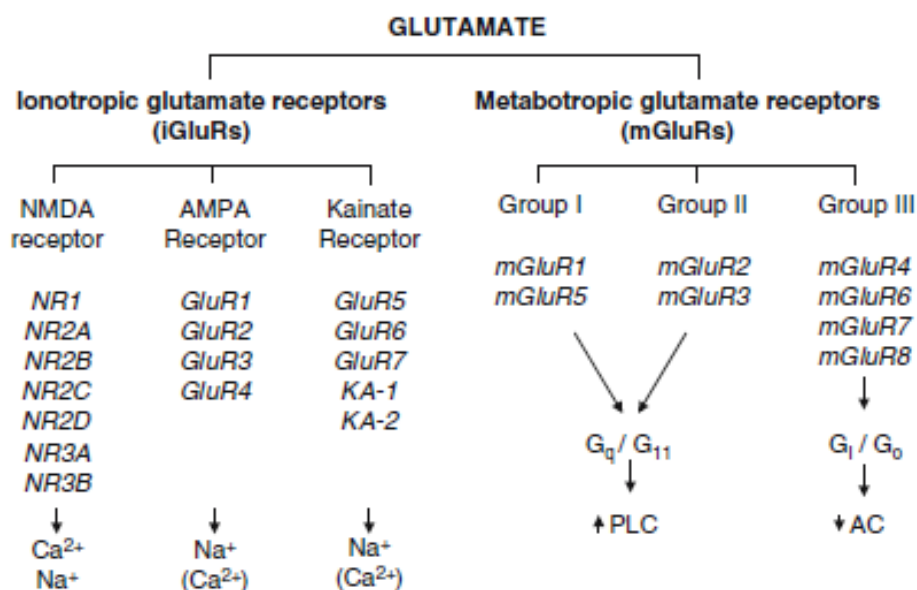


Fig 2.1-Illustrazione delle famiglie di recettori del glutammato, delle loro subunità note e dei meccanismi primari di trasduzione del segnale. PLC (Fosfolipasi C); AC (Adenilato ciclasi) [29].

Dal momento che una delle linee di ricerca del nostro laboratorio ha recentemente portato alla dimostrazione dell'esistenza di un legame tra recettori metabotropici del glutammato (mGluRs) e sistema immune, si è voluto verificare se tali recettori venissero espressi anche in vescica e potessero contribuire all'instaurarsi di alcuni meccanismi di immunità innata, anche alla base del fatto che è stata ampiamente documentata la capacità di *Escherichia coli* di sintetizzare glutammato [30], [31] e che le risposte cellulari degli mGluRs coinvolgono il cAMP, per il quale è stato dimostrato che il suo aumento intracellulare favorisce l'espulsione dei batteri dalle cellule uroteliali infette.

La presenza dei recettori metabotropici del glutammato è stata inoltre già descritta in molti organi periferici [32].

Otto sono i membri appartenenti alla famiglia dei recettori per il glutammato accoppiati a proteine G (mGluR1-8), suddivisi in tre gruppi in base all'omologia di sequenza, ai secondi messaggeri utilizzati e al tipo di farmacologia: gruppo I (mGluR1 e 5), gruppo II (mGluR2 e 3) e gruppo III (mGluR4, 6, 7 e 8). Inoltre, sono state identificate numerose varianti di splicing per tali recettori [29].

I recettori di gruppo I sono accoppiati principalmente alla fosfolipasi C attraverso le proteine G_q/G_{11} , con conseguente produzione di inositolo-trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG), responsabili del rilascio intracellulare di calcio e dell'attivazione di protein-chinasi C (PKC); inoltre, essi attivano i canali del calcio di tipo L e di tipo N e inibiscono i canali del potassio.

I recettori di gruppo II agiscono attraverso l'inibizione dell'adenilato ciclasi attraverso il sistema proteico G_i/G_o , determinando una riduzione dei contenuti intracellulari di cAMP. Inibiscono i canali del calcio di tipo L e N.

Determinano, inoltre, iperpolarizzazione di membrana mediante attivazione dei canali del potassio. In entrambi i casi, la loro azione sui canali provoca una riduzione dell'eccitabilità neuronale.

Possiedono, infine, effetti neuroprotettivi ed antiapoptotici, che vengono mediati attraverso l'attivazione della MAPK e della PI-3-chinasi.

Anche i recettori metabotropici del glutammato di gruppo III agiscono attraverso le proteine G_i/G_o e condividono le stesse funzioni dei recettori di gruppo II.

In generale, gli mGluRs esplicano principalmente una funzione modulatoria, regolando l'eccitabilità neuronale, la plasticità e la trasmissione sinaptica. Le vie di segnalazione mediate dagli mGluRs agiscono sia mediante l'attivazione di secondi messaggeri intracellulari e successiva regolazione di effettori a valle, sia attraverso

L'attivazione diretta delle subunità $\beta\gamma$ della proteina G eterotetramerica [33]. Con l'eccezione di mGluR6, la cui localizzazione è confinata alla retina, tutti i membri della famiglia degli mGluRs sono espressi nel sistema nervoso centrale dei mammiferi, sia nelle cellule neuronali che gliali. Sono inoltre espressi in varie aree del sistema nervoso periferico: sono stati identificati in cuore, timo, pancreas, fegato, intestino, osso, testicoli, cute, papille gustative e sono coinvolti in numerose funzioni, come il controllo degli stadi di differenziamento nelle cellule staminali embrionali, il controllo della produzione ormonale nel pancreas, la regolazione della mineralizzazione e dello sviluppo della cartilagine, la modulazione della produzione delle citochine linfocitarie e della funzione secretoria gastrointestinale [32].

I recettori metabotropici di gruppo I sono recettori di tipo eccitatorio, tipicamente localizzati a livello postsinaptico nei domini somatodendritici, dove rinforzano la trasmissione glutammatergica durante fenomeni di plasticità (apprendimento, memoria e coordinazione motoria). Inoltre, modulano positivamente il rilascio di glutammato e negativamente (mGlu1a) il rilascio di GABA (acido g-amino-butyrico).

I recettori metabotropici di gruppo II sono espressi in maniera predominante a livello presinaptico, nei domini assonici e nelle terminazioni degli assoni, dove svolgono un ruolo di tipo inibitorio sulla sinapsi glutammatergica, riducendo il rilascio di glutammato solo durante i processi di ipereccitabilità neuronale; non intervengono in caso di trasmissione sinaptica eccitatoria normale.

Il recettore mGlu2, inoltre, controlla in senso inibitorio il rilascio di GABA. Il recettore mGlu3 può essere localizzato anche a livello postsinaptico, ma è espresso primariamente dalle cellule gliali.

I recettori di gruppo III hanno una localizzazione prevalentemente presinaptica e svolgono un controllo di tipo inibitorio sui livelli di glutammato extracellulare.

I recettori metabotropici del glutammato sono recettori di membrana costituiti da un dominio bilobato N-terminale extracellulare, connesso attraverso una regione ricca di residui cisteinici a 7 domini transmembranari, e da una porzione C-terminale intracellulare (di lunghezza variabile). I 7 domini sono collegati da sei loop, di cui tre extracellulari e tre intracellulari [29].

La regione N-terminale è responsabile del legame con il glutammato e può presentarsi in due configurazioni: “aperta” in assenza di ligando e “chiusa” in sua presenza. La struttura bilobata è anche sede del legame di agonisti e antagonisti competitivi.

La regione a 7 domini transmembrana ha la funzione di accoppiare il recettore a proteine G ed è anche il sito di legame di antagonisti non competitivi (**Fig. 2.2**).

La regione C-terminale, grazie a siti di fosforilazione, è responsabile dei meccanismi deputati alla regolazione dell'attività recettoriale; determina, inoltre, il corretto inserimento del recettore nella membrana plasmatica, la specifica localizzazione in varie sedi del neurone, l'interazione con altri recettori di membrana grazie al legame con proteine citoplasmatiche. Per il loro corretto funzionamento, tutti i membri di questa famiglia di recettori sono organizzati a formare delle strutture dimeriche (omodimeri) stabilizzate da legami disolfuro.

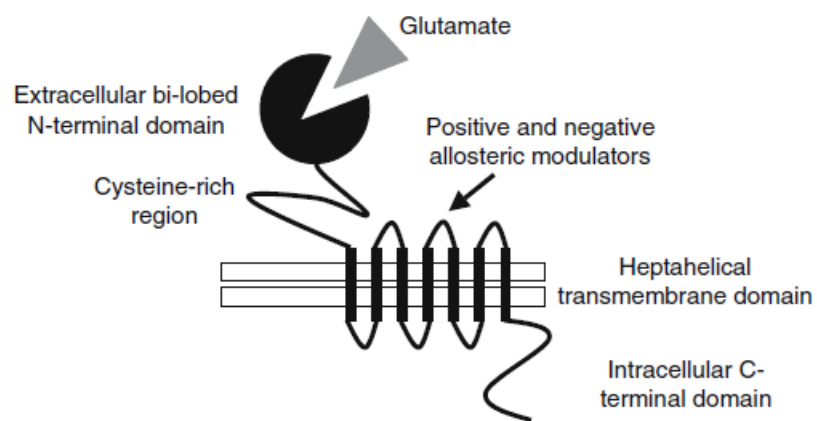


Fig. 2.2-Rappresentazione schematica di un membro della famiglia dei recettori metabotropici per il glutammato [29].

3. MATERIALI E METODI

3.1 Batteri e linee cellulari

I ceppi batterici utilizzati per generare le infezioni erano dei sierotipi uropatogeni di *E. coli* (O1, O2, O55, O111) (Istituto Pasteur, Parigi, Francia).

La linea cellulare usata è la 5637 (HTL01017), carcinoma di vescica umana (Banca Biologica e Cell Factory, Genova, Italia). La linea cellulare è stata coltivata in RPMI 1640 con aggiunta di 10% FBS e 2 mM L-Glutammina.

3.2 Modelli animali

Per l'induzione del danno al midollo spinale (SCI), topi CD1 sono stati anestetizzati ed è stata praticata un'incisione longitudinale sulla linea mediana del dorso asportando i muscoli paravertebrali ed esponendo le vertebre T5-T8. A livello delle vertebre T6-T7 è stata praticata una laminectomia ed il danno è stato prodotto attraverso una compressione extradurale del midollo. Gli animali sono stati sacrificati a sette e a quindici giorni dall'induzione del trauma e le vesciche espianate e congelate a -80°C, sono state inviate in ghiaccio secco ai nostri laboratori.

Sono state analizzate diciassette vesciche, delle quali: sette espianate da animali di controllo e dieci da animali con SCI. Degli animali con SCI, cinque sono stati sacrificati a sette giorni e i restanti a quindici giorni dall'induzione del trauma.

Per l'analisi degli mGluRs sono stati utilizzati topi C57BL6N maschi di otto settimane ($n = 6$), mantenuti in condizioni di stabulazione conformi alle direttive nazionali per la sperimentazione animale e seguendo adeguate misure per minimizzare la sofferenza animale. I topi sono stati stabulati per una settimana in gabbie singole con cicli di luce/buio di 12 ore e con libero accesso ad acqua e cibo.

Dopo sette giorni gli animali, previa anestesia, (ketamina, 100 mg/kg + xilazina 5 mg/kg i.p.) sono stati sacrificati e le vesciche sono state prelevate, fissate con una soluzione di paraformaldeide tamponata al 4% (pH 7,4) e mantenute in questa soluzione per tutta la notte. Quindi sono state lavate 5 minuti in acqua distillata e mantenute in una soluzione di etanolo al 70% fino al momento dell'inclusione in paraffina.

Le vesciche sono state quindi tagliate al microtomo in sezioni seriali di 6 micron, sparaffinate in xilene e quindi poste in soluzioni decrescenti di alcool (etanolo 100%-96%-70%). Le sezioni così ottenute sono state processate per ematossilina-eosina al fine di valutare l'integrità del preparato.

3.3 Analisi dell'espressione dell'mRNA mediante RT-PCR e RT-qPCR

Le vesciche sono state lisate in Tri Reagent (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (1 ml di reagente per ogni 50-100mg di tessuto), mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore (ULTRA TURRAX T25 basic).

Il lisato cellulare ottenuto è stato utilizzato per l'estrazione dell'RNA totale.

Dopo un primo step di centrifugazione a 4°C a 12.000g per 10', necessario per la rimozione dei materiali insolubili, il protocollo ha previsto le seguenti fasi:

- ✓ **fase di separazione:** i campioni sono stati incubati per 5' a temperatura ambiente con 0,2 ml di cloroformio per ogni ml di Tri Reagent aggiunto in precedenza, al fine di consentire la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici;
- ✓ **precipitazione dell'RNA:** è stato aggiunto isopropanolo (0,5 ml per ogni ml di Tri Reagent) e i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione per 10' a 4°C, a 12.000g;
- ✓ **lavaggio dell'RNA:** dopo aver rimosso il surnatante, i pellet ottenuti sono stati lavati con etanolo al 75% (1 ml per ogni ml di Tri Reagent) e centrifugati per 5' a 4°C, a 7.500g;
- ✓ **risospensione dell'RNA:** i pellet sono stati asciugati, risospesi in acqua nuclease free e conservati a -80°C

L'acido nucleico è stato dosato tramite misurazione dell'assorbanza a 260 nm con biofotometro (Biorad, Milano, Italia). Il valore di assorbanza è stato convertito in concentrazione di RNA espressa in µg/µl.

È stata valutata, inoltre, l'integrità dell'acido nucleico mediante corsa su gel di agarosio all'1%.

Per i campioni nei quali è stata rilevata una contaminazione da DNA genomico, si è proceduto ad eseguire un trattamento con DNAsi: a 2,5µg di RNA, sono stati aggiunti:

- 1µl di DNasi I (1unità/ µl), (Fermentas, Mmedical, Cornaredo, Italia);
- 1µl di buffer di reazione con MgCl₂ (10X);

- acqua nuclease free per portare a volume (a 9µl).

Dopo una prima incubazione a 37°C per 30', è stato aggiunto 1µl di EDTA (25mM) a tutti i campioni sottoposti al trattamento.

Si è proceduto ad effettuare una nuova incubazione a 65°C per 10' ed è stata eseguita nuovamente la lettura al biofotometro.

Successivamente, i campioni di RNA sono stati retrotrascritti in cDNA mediante uso dell'enzima trascrittasi inversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase, (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) ed esameri random; per ogni campione sono stati retrotrascritti 2µg di RNA.

È stata allestita la seguente reazione:

- 2µg di RNA;
- 1µl di esameri random (20 µM);
- 1µl di dNTPs (10 mM);
- acqua per portare il volume a 10µl.

La miscela è stata incubata a 70°C per 10' e sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- 1µl di M-MLV (200unità/µl);
- 2µl di buffer dell'enzima (10X);
- 0.5µl di inibitore dell'RNAsi (40 unità/µl);
- 6.5µl di acqua ($V_{finale}=20 \mu l$).

I campioni sono stati sottoposti al seguente programma termico:

- 25 °C per 10';
- 37 °C per 50';
- 90 °C per 10'.

La verifica delle condizioni ottimali per la successiva analisi in qPCR e l'analisi degli mGluRs è stata effettuata mediante PCR semi-quantitativa.

A tal fine sono stati disegnati i primers delle uroplachine, delle citocheratine 17 e 20, di Rab27b, degli mGluRs e della β -actina (**Tab.3.3.1**), scelta come housekeeping, mediante l'uso del free-tool bioinformatico Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>); successivamente tali oligo sono stati analizzati mediante l'utilizzo del software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Gene symbol	Nucleotide sequence	PCR product (bp)
CK17	5'-CAT CCT GCT CCA GAT TGA CA-3' 5'-GGC CTC TCA GAG CATTCA TC-3'	233
CK20	5'-CCC AGA AGA ACC TGCAAG AG-3' 5'-ACG AGC CTT GAC GTC CTC TA-3'	212
UpIa	5'-TGT CGT CGT CGG TAC ATG AT-3' 5'-CAG AGT CGG GTT AGC TCC TG-3'	191
UpIb	5'-CCT CTT CTG CTT GTC CGT TC-3' 5'-CTG CTT CAG GAA GAG GTT GG-3'	169
UpII	5'-CTA CAC CGT CAC AAG GCT CA-3' 5'-GCA CTG TGA TGA CCA CCA TC-3'	200
UpIIIa	5'-GCC TCT GTG CAT GTT CGA TA-3' 5'-AAG TCA CCA CAA GGG GTC AG-3'	207
Rab27b	5'-CCA GAC CAA AGG GAA GTC AA-3' 5'-GTG TCC GGA ACC TGT GTC TT-3'	177
β-actina	5'-TGT TAC CAA CTG GGA ACG ACA-3' 5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3'	165
mGluR1	5'-AAATCTACAGCAATGCTGGCGA-3' 5'-CTTCGATGACTTCATCTCTGTC -3'	207
mGluR2	5'-AGAAGGTGGGCCGTGCCATGAG -3' 5'-TTGCCTGCCCCGAGATAGGT -3'	673
mGluR3	5'-GCTCCAACATCCGCAAGTCCTA-3' 5'-TGTCAATGGCCAGGTGCTTGTC -3'	396
mGluR4	5'-GGCCCTCAAGTGGAATATG-3' 5'-CTCGTTGGCAAAGATGATGA-3'	220
mGluR5	5'-CCCAGAATGAGAAGAGCACC-3' 5'-TCTGCGAAGGTCGTCATGGT -3'	580
mGluR7	5'-CCTGGTTATCGTCTCATTGG-3' 5'-CACACAGAGGGTGGGATCT-3'	101
mGluR8	5'-CCACCCATATTACCAAGC-3' 5'-CTGGGGCTGTAGATGCATAG-3'	133

Tab 3.3.1 Sequenze nucleotidiche utilizzate per l'analisi in RTqPCR.

Per ogni gene e per ogni campione è stata preparata una mix contenente:

- 10µl di REDTaq-ReadyMix (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 0.6µl di Primer Forward (10µM);
- 0.6µl Primer Reverse (10µM);
- 1µl di cDNA;
- 7.8µl di H₂O (V_{tot}=20 µl).

La miscela è stata sottoposta al seguente programma termico:

- 95 °C x 5';
 - 95 °C x 30'';
 - 58 °C x 45'';
 - 72 °C x 45'';
- } **X 30 CICLI**
- 72 °C x 10';
 - 4 °C x ∞.

La reazione è stata realizzata su un termociclatore Mastercycler gradient (Eppendorf, Milano, Italia). I prodotti di amplificazione sono stati risolti mediante corsa su gel di agarosio al 2%.

La valutazione dei livelli di espressione genica è stata effettuata mediante qPCR, eseguita utilizzando la mix *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Bio Systems, Monza, Italia). Quest'ultima è così composta:

- SYBR® Green I dye;
- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase;
- dNTPs;
- optimized buffer components;
- MgCl₂;

- ROX™ dye.

È stata allestita la seguente reazione, in accordo con il protocollo fornito dalla ditta:

- 12,5µl di *Power SYBR® Green PCR Master Mix*;
- 0,6µl di primer forward (10µM);
- 0,6µl di primer reverse (10µM);
- 10,3µl di acqua nuclease free;
- 1µl di cDNA, ottenuto dalla precedente retrotrascrizione.

Con l'utilizzo del termociclatore, Eppendorf Mastercycler® ep *realplex* (Eppendorf, Milano, Italia), la miscela preparata è stata sottoposta al seguente programma termico:

- 95 °C x 10';
 - 95 °C x 30'';
 - 58 °C x 45'';
 - 72 °C x 45'';
- } **X 40 CICLI**
- 72 °C x 10';
 - 4 °C x ∞.

Al termine della PCR il software genera le curve di melting che sono indicative della purezza degli amplificati.

3.4 Analisi dell'espressione proteica mediante western blot

Le vesciche sono state omogeneizzate a 4°C, con ausilio di un mortaio, in buffer di lisi (Ripa buffer) così preparato (10 ml):

- 5 ml di tris HCl pH 7,5 (100 mM);
- 100 µl di IGEPAL 100%;
- 100 µl di SDS 10%;
- 300 µl di NaCl (5 M).

A questa miscela è stato aggiunto un cocktail di inibitori delle proteasi, al fine di ridurre la degradazione delle proteine durante l'estrazione. Questo è così composto:

- 100 µl di EDTA 0,5 M;
- 100 µl di PMSF (fenilmetilsulfonilfluoride) (100 mM in isopropanolo);
- 400 µl di cocktail di inibitori delle proteasi (aprotinina, leupeptina, pepstatina, 1X);
- acqua per portare il volume a 10 ml.

In aggiunta, il lisato è stato sottoposto a sonicazione, a seguito della quale è stata misurata la concentrazione proteica tramite saggio di bradford.

A 30µg di proteina sono stati aggiunti 300 µl di blu di bromofenolo e Tris per portare ad un volume finale di 1 ml. Per la determinazione degli mGluRs, le proteine sono state risospese in un buffer riducente con SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) e blu di bromofenolo, con aggiunta di 40 mM di threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol (DTT), per limitare la formazione di dimeri del recettore.

Sono stati caricati 30 µl per pozzetto su gel di poliacrilammide al 10% per le uroplachine e all'8% per gli mGluRs, in presenza di SDS (SDS-PAGE,

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) per far avvenire la separazione elettroforetica delle proteine sulla base del peso molecolare.

Lo stacking gel è stato preparato come segue:

- 0,85 ml di acrilammide al 30%;
- 50 µl di SDS al 10%;
- 10 µl di TEMED;
- 1,2 ml di Tris 0,5 M (pH 6,8);
- 50 µl di ammonio persolfato;
- 2,7 ml di acqua distillata.

Il gel di corsa è composto dagli stessi ingredienti dello stacking gel, eccetto che per il tampone, che ha un pH più alto:

- 5 ml di acrilamide al 30%;
- 3,8 ml di Tris (pH 8,8) 1,5 M;
- 0,15 ml di SDS al 10%;
- 0,15 ml di ammonio persolfato 10%;
- 6 µl di TEMED;
- 5,9 ml di acqua distillata.

Durante la corsa (eseguita a 100 V) il gel è stato immerso in un tampone contenente Tris-Glicina e SDS, al fine di favorire la migrazione delle proteine e di aumentare il grado di denaturazione, fornendo ulteriori cariche negative alle catene polipeptidiche.

Una volta terminata la corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su un supporto solido, rappresentato da una membrana di PVDF (polivinildenfluoruro) (Biorad, Milano, Italia) per 1h.

Il gel è stato smontato dall'apparato di corsa ed equilibrato per circa 15' in un tampone di trasferimento composto da acqua, Tris-Glicina 1X, SDS allo 0,1% e metanolo al 20%, mentre la membrana è stata stabilizzata in acqua distillata per 10'.

È stato quindi preparato il “sandwich” di trasferimento nel quale la membrana e il gel sono stati messi a contatto e inseriti in un apparato contenente della carta assorbente.

Il gel è stato posizionato dal lato del catodo, mentre la membrana da quello dell'anodo, poichè le proteine, conservando la carica negativa fornita dall'SDS, tendono a migrare verso il polo positivo.

Il trasferimento è stato effettuato a 4°C applicando una corrente di 100 V per 1h.

Al termine del trasferimento la membrana è stata messa per qualche minuto in rosso Ponceau; questo colorante si lega alle proteine consentendo di verificare l'efficienza del trasferimento e l'eventuale presenza di bolle. Esso è stato in seguito rimosso, tramite agitazione in TBS-Tween fino alla decolorazione della membrana, che è stata a questo punto saturata effettuando un'incubazione con latte al 2,5% (in TBS-Tween) overnight, in agitazione, coprendo con carta d'alluminio.

La fase successiva ha previsto l'incubazione della membrana con gli anticorpi per le uroplachine (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e per il peptide (KQFVPTVCNGREVVDSTTSSL) corrispondente agli amminoacidi 853-872 di mGluR2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, US); è stato utilizzato anche un anticorpo monoclonale diretto contro la β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Per le uroplachine, l'anticorpo primario, diretto contro la proteina di interesse, è stato preparato in latte al 2,5% (1:1000) e incubato per 2h in agitazione, a temperatura ambiente, coperto con alluminio. Al termine delle due ore, sono stati effettuati tre

lavaggi in Tween-20 Tris-buffered saline (TTBS) (100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 1% Tween 20, pH 7.4), della durata di 15' per la rimozione dell'anticorpo non legato.

Si è proceduto, quindi, all'incubazione della membrana con l'anticorpo secondario (1:1000 in latte al 2,5%), coniugato con perossidasi, che ha avuto una durata di due ore a temperatura ambiente.

Per gli mGluRs, i filtri sono stati bloccati overnight in TTBS contenente latte al 5%. Sono stati, in seguito, incubati per 1h a temperatura ambiente con un anticorpo primario policlonale per il recettore mGlu2/3 (1:1000). I blots sono stati lavati per tre volte in TTBS buffer e incubati per 1h con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (1:10000) (Amer-sham, Milano, Italia).

Le membrana sono state poste in liquido di sviluppo (ECL), (Amersham, Milano, Italia) ed impressionate su lastra.

3.5 Analisi in immunoistochimica

Una serie di sezioni è stata processata per l'immunoistochimica per mGluR2/3 e per la uroplachina III effettuando un doppio staining sulla stessa sezione. Come controllo dell'esperimento sono stati utilizzati animali knock-out per i recettori mGlu2-mGlu3.

3.5.1 Immunofluorescenza

Le sezioni sono state sottoposte prima ad un protocollo di deprotezione antigenica al microonde utilizzando un tampone citrato acidificato a pH 5 per 10'. In seguito le sezioni sono sottoposte alla permeabilizzazione con il Triton x-100 per 15'. Quindi è stato utilizzato un blocco in siero, con i sieri specifici per i secondari utilizzati, tenuto per 1h (10% in PBS). Gli anticorpi primari sono stati diluiti in siero specifico al 2% in PBS. Sono stati utilizzati anti-mGluR2/3 (1:5; Chemicon, Temecula, CA, USA) generato in coniglio e anti-uropachina III (1:50; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) generato in capra, mantenuti sulle sezioni per tutta la notte. Le sezioni sono state quindi sottoposte all'anticorpo secondario specifico per ogni primario utilizzato e mantenuto per 1h (è stato usato il fluorocromo blu per l'mGluR2/3 e il fluorocromo CY3 rosso per la uropachina III). Il controllo negativo è stato effettuato omettendo l'anticorpo primario.

3.5.2 Immunoperossidasi

Un'altra serie di sezioni è stata trattata per immunoperossidasi. Le sezioni sono state sottoposte prima ad un protocollo di deprotezione antigenica al microonde utilizzando un tampone citrato acidificato a pH 5 per 10'. In seguito le sezioni sono sottoposte alla permeabilizzazione con il Triton x-100 per 15'. È stato quindi utilizzato per l'immunoistochimica un kit polimerico, il super sensitive IHC detection systems (Biogenex, San Ramon, CA, USA) e le sezioni sono state

visualizzate mediante la diaminobenzidina (DAB). Il controllo negativo è stato effettuato sia utilizzando l'animale doppio knock-out per i recettori metabotropici mGlu2/3, sia omettendo l'anticorpo primario dalle sezioni.

3.6 Saggio di internalizzazione batterica

Uroepiteliociti della linea cellulare 5637 sono stati seminati e portati a confluenza su piastre da 24 pozzetti (100.000 cellule/pozzetto). Dopo aver effettuato due lavaggi con DPBS per allontanare l'antibiotico presente nel terreno di coltura, le cellule sono state incubate per 2h a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂ con *Escherichia coli* (10⁴ UFC/ml).

Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state lavate due volte con DPBS e trattate con un modulatore allosterico positivo e con un antagonista recettoriale, entrambi selettivi per il recettore mGlu3, e con forskolin, che costituiva il controllo positivo, sciolti in RPMI contenente gentamicina a una concentrazione di 100 µg/ml.

I farmaci usati sono stati i seguenti:

- LY341495, alle concentrazioni di 1µM e 0,5 µM;
- LY379268, alle concentrazioni di 1µM e 0,5 µM;
- forskolin, alle concentrazioni di 50 µM, 1µM e 0,5 µM.

Dopo 1,5h le cellule sono state lavate due volte con DPBS e ad ogni pozzetto è stato aggiunto 1ml di Triton X-100 allo 0,1 % in DPBS per 15' a temperatura ambiente. Le cellule sono state staccate con l'ausilio di uno scraper e 200 µl di lisato cellulare

sono stati seminati su Mueller Hinton Agar e incubati overnight a 37°C. In seguito all'incubazione si è proceduto alla conta delle colonie batteriche.

Il saggio di internalizzazione è stato effettuato anche mediante lettura al citofluorimetro. In questo caso 10^4 UFC/ml di *E.coli* sono state marcate con 1μM di CFSE (CFDA-SE (5-(and

6-)carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 20' a temperatura ambiente. Successivamente sono stati effettuati due lavaggi in DPBS e i batteri sono stati risospesi in RPMI e piastrati sulle cellule 5637. Dopo 2h di incubazione sono stati effettuati due lavaggi in DPBS.

Le cellule sono state poi trattate con:

- LY341495, alle concentrazioni di 1μM e 0,5 μM;
- LY379268, alle concentrazioni di 1μM e 0,5 μM;
- forskolin, alle concentrazioni di 50 μM, 1μM e 0,5 μM

sciolti in RPMI contenente gentamicina a una concentrazione di 100 μg/ml.

Dopo un periodo di incubazione di 1,5h sono stati effettuati due lavaggi in DPBS e le cellule, dopo essere state staccate con l'ausilio di uno scraper, sono state analizzate al citofluorimetro FACSCanto (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.7 Misurazione dei livelli di cAMP

Uroepiteliociti della linea cellulare 5637 sono stati seminati e portati a confluenza su piastre da 24 pozzetti (100.000 cellule/pozzetto). Dopo aver aspirato il mezzo di coltura, è stato effettuato un lavaggio veloce con Locke solution, così preparata (25 ml):

- 0,225 g di NaCl;
- 25 mg di glucosio;
- 27,5 mg di Hepes acid;
- 3,605 mg di CaCl_2 ;
- 10,4 mg di KCl;
- 7,65 mg di NHCO_3

sciolti, nell'ordine riportato, in acqua.

La soluzione è stata portata a pH 7,4 con NaOH 0,5 N.

Le cellule sono state trattate per 20' con un inibitore aspecifico delle fosfodiesterasi del cAMP, l'IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), sciolto in DMSO 100 mM, e portato a una concentrazione finale di 500 μM in Locke solution.

Successivamente, è stata aspirato la soluzione e sono stati aggiunti i farmaci di seguito riportati, sciolti in RPMI completo:

- LY341495, alle concentrazioni di 5 μM , 1 μM e 0,5 μM ;
- LY379268, alle concentrazioni di 5 μM , 1 μM e 0,5 μM ;
- forskolin, alle concentrazioni di 10 μM , 5 μM e 1 μM .

Dopo 15' è stato aspirato il mezzo e sono stati aggiunti 100 µl di sample diluent fornito dal kit utilizzato per la misurazione dei livelli di cAMP (Arbor Assays, Eisenhower Place, MI, USA).

Dopo incubazione per 10' a temperatura ambiente le cellule sono state recuperate con l'aiuto di uno scraper e processate secondo le istruzioni del fornitore del kit.

4. RISULTATI

Al fine di chiarire i meccanismi che potrebbero determinare la maggiore predisposizione di pazienti con patologie neurodegenerative alle UTIs, la linea di ricerca ha previsto lo studio, in modelli murini di neurodegenerazione di natura traumatica (SCI), dell'espressione di markers di differenziamento uroteliale e delle principali proteine presenti nelle placche uroteliali.

Per monitorare l'entità del cambiamento dell'uroepitelio vescicale, si è deciso di seguire dapprima le variazioni dell'espressione genica di due principali marcatori di differenziamento uroepiteliale, le citocheratine (CKs) 17 e 20: infatti, la prima risulta espressa a livello degli strati intermedio e basale, mentre la seconda è presente a livello dello strato superficiale [34], (**Fig. 4.1**).

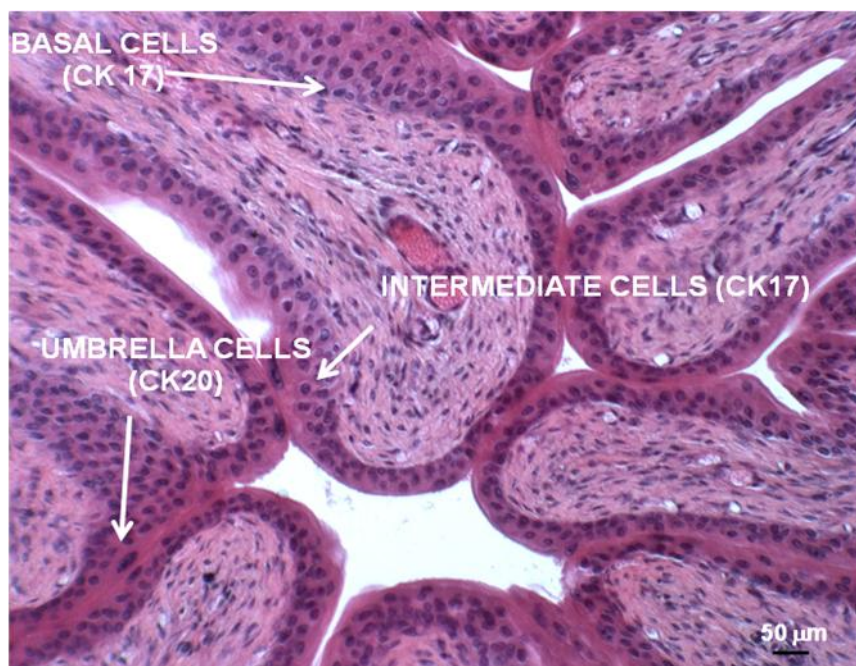


Fig. 4.1- Colorazione in ematossilina-eosina di una sezione di vescica di topo. In evidenza i tre strati dell'uroepitelio: gli strati basale ed intermedio, marcati dalla citocheratina 17, e lo strato superficiale, costituito dalle cellule a ombrello, positivo alla citocheratina 20.

Con l'ausilio della metodica di RTq-PCR, è stata condotta una valutazione dell'espressione del mRNA ottenuto da vesciche di topi SCI sacrificati a sette (n=5) ed a quindici giorni (n=5) dall'induzione del danno midollare, rapportando i valori a quelli registrati in topi sani (n=7).

Dai dati ottenuti sugli mRNA corrispondenti alle due proteine emerge una significativa modulazione della loro espressione in relazione al time course rispetto ai livelli basali: la CK20 subisce una riduzione del 60% dopo sette giorni dall'induzione del trauma midollare, che si mantiene anche dopo quindici giorni, mentre la CK17 ha fatto registrare un aumento del livello di espressione a sette giorni, che, negli animali sacrificati a quindici giorni dall'induzione del trauma, ha raggiunto un livello pari ad almeno il doppio rispetto ai controlli.

In grafico (**Fig. 4.2, a e b**) è stato riportato l'andamento della variazione dei livelli di espressione in relazione al time course. I valori sono stati ottenuti dopo normalizzazione rispetto ad un gene housekeeping, assumendo che valori di espressione in condizioni normali siano corrispondenti a 1.

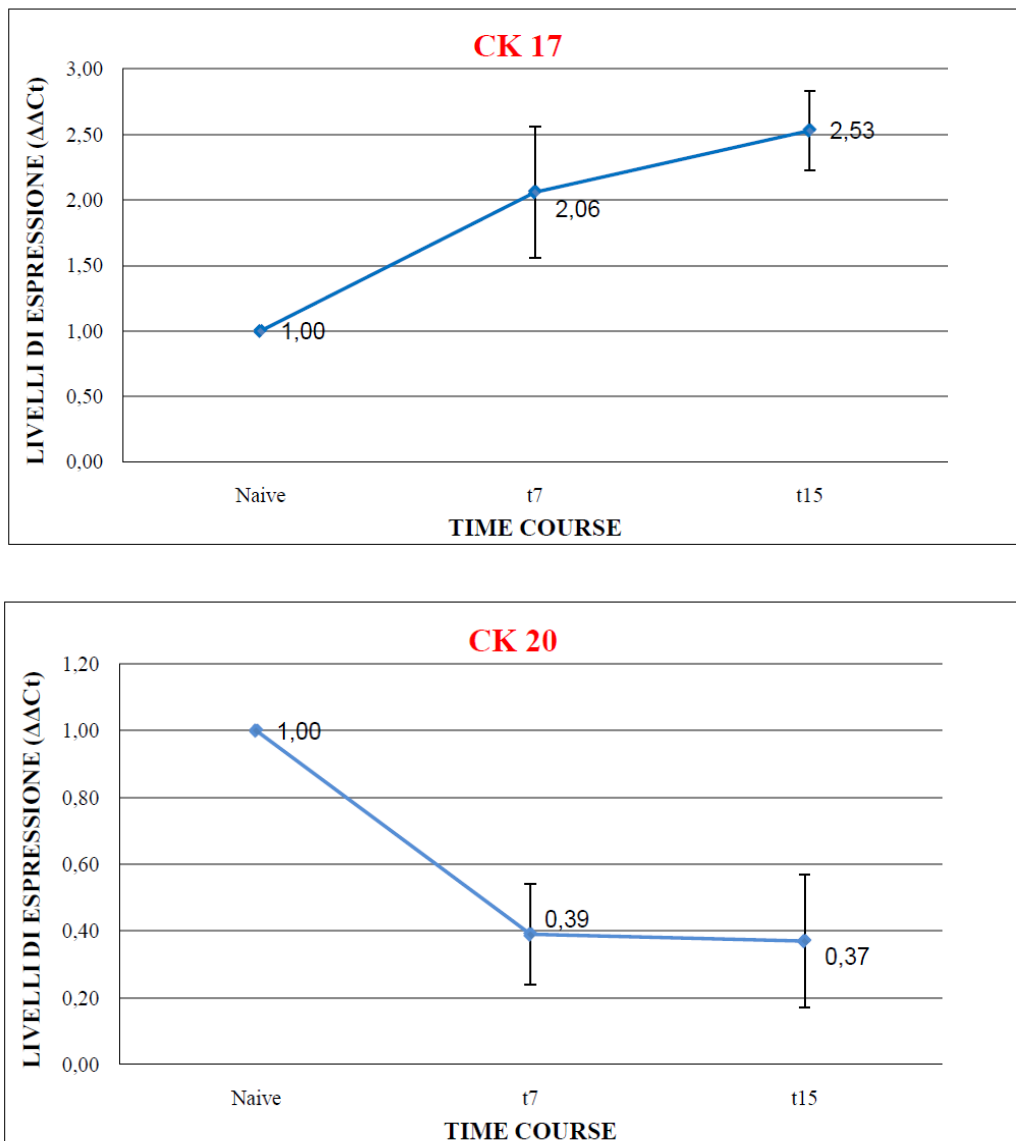


Fig. 4.2- Livelli di espressione delle citocheratine 17 (a) e 20 (b) in vesciche ottenute da topi SCI sacrificati dopo sette (n=5) e quindici giorni (n=5) dall'induzione del trauma, rispetto a topi naive (n=7) e. L'analisi è stata effettuata in RTqPCR, mediante il metodo del $\Delta\Delta C_t$ [35]. Come gene housekeeping è stata scelta la β -actina.

All'analisi delle citocheratine è seguita la valutazione dei livelli di espressione delle uroplachine, responsabili della funzione di barriera dell'urotelio, grazie al loro contributo nella formazione delle placche uroteliali, e della proteina Rab27b, marker delle vescicole fusiformi, responsabili del traffico vescicolare delle uroplachine dal citoplasma delle cellule a ombrello alla membrana plasmatica e viceversa, allo scopo di verificare se l'uroepitelio sia soggetto ad alterazioni delle placche uroteliali e, conseguentemente, a compromissione della sua funzione di barriera di permeabilità.

Anche in questo caso, sono state registrate delle profonde variazioni del livello di mRNA tra animali di controllo e animali soggetti a trauma midollare, il cui andamento è risultato simile per tutte e quattro le uroplachine.

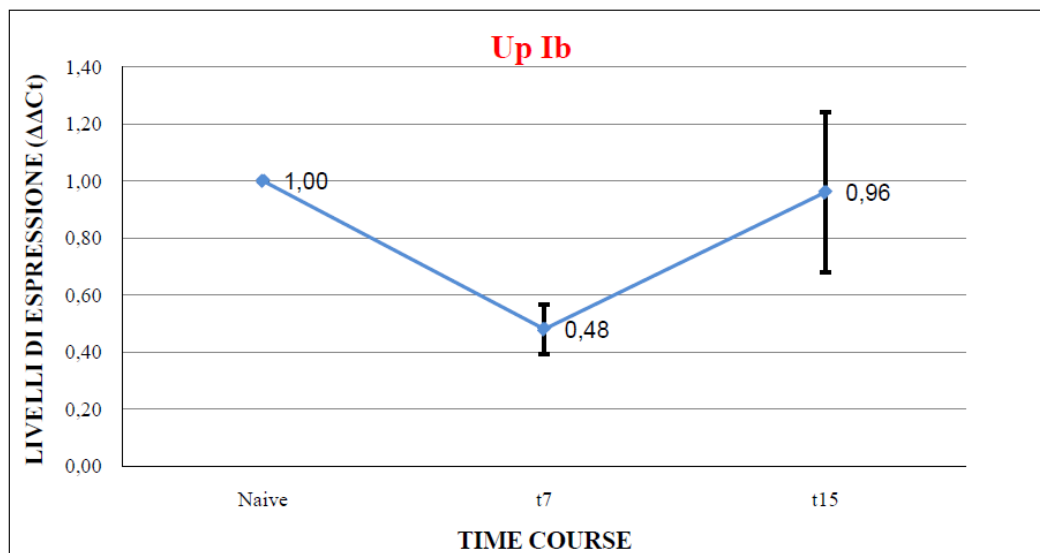
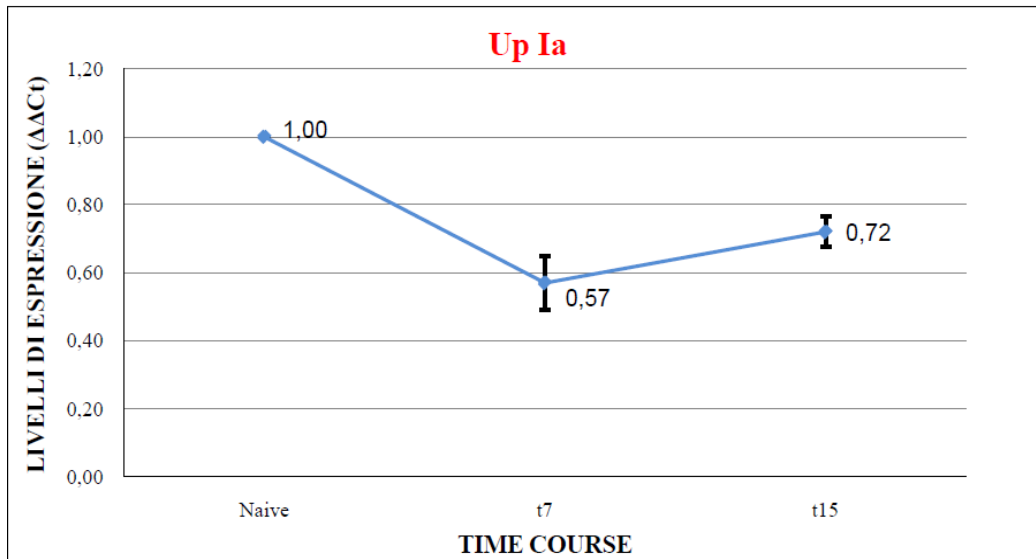
In linea generale, si assiste ad una netta diminuzione dei valori di espressione dopo sette giorni dall'induzione del danno; i valori subiscono poi un leggero aumento negli animali sacrificati a quindici giorni.

Nello specifico, la UPIa mostra una riduzione del 43% a sette giorni e un successivo incremento di circa il 30% a quindici giorni, che in ogni caso non raggiunge i valori riscontrati negli animali sani (**Fig. 4.3, a**).

Anche per la UPIb si registra un comportamento simile, ma al contrario della UPIa, a quindici giorni dal trauma riesce a ripristinare quasi totalmente il suo livello di espressione (**Fig. 4.3, b**).

La UPII ha un trend del tutto simile a quello della UPIa: all'inizio, infatti, il suo livello di espressione subisce una riduzione del 60% in seguito un incremento del 10% (**Fig. 4.3, c**).

Il trend più interessante appare quello della UPIII, che, seppure dopo sette giorni subisca un calo del 10% rispetto ai controlli, fa poi misurare un incremento del suo livello di espressione, che le consente di superare quello dei topi naive (Fig. 4.3, d).



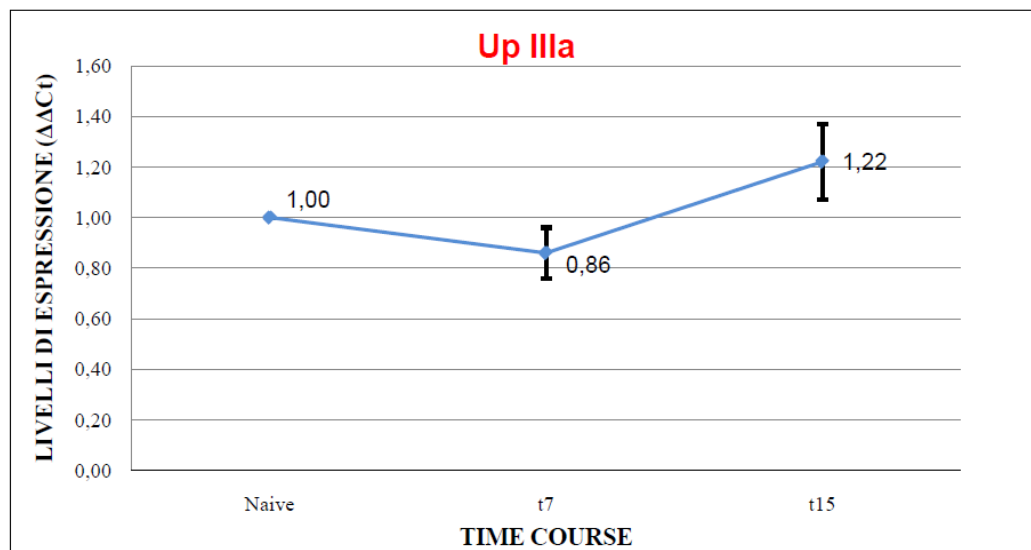
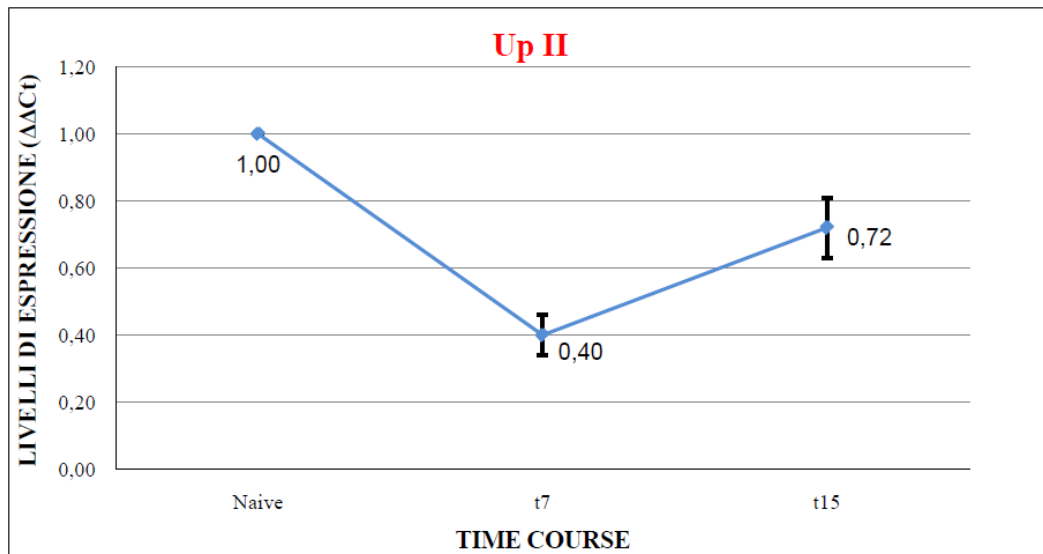


Fig. 4.3- Livelli di espressione delle UPIa (a), UPIb (b), UPII (c) e UPIIIa (d) in vesciche ottenute da topi SCI sacrificati dopo sette (n=5) e quindici giorni (n=5) dall'induzione del trauma, rispetto a topi naive (n=7). L'analisi è stata effettuata in RTqPCR, mediante il metodo del $\Delta\Delta Ct$ [35]. Come gene housekeeping è stata scelta la β -actina.

La **Fig. 4.4** mostra le bande relative agli amplificati, ottenuti mediante una reazione di PCR semiquantitativa, della UPIa (191 bp), Ib (169 bp), II (200 bp), IIIa (207 bp). Come controllo interno è stato usato l'housekeeping β -actina (165 bp). I prodotti della PCR sono stati risolti su gel di poliacrilammide al 2%.

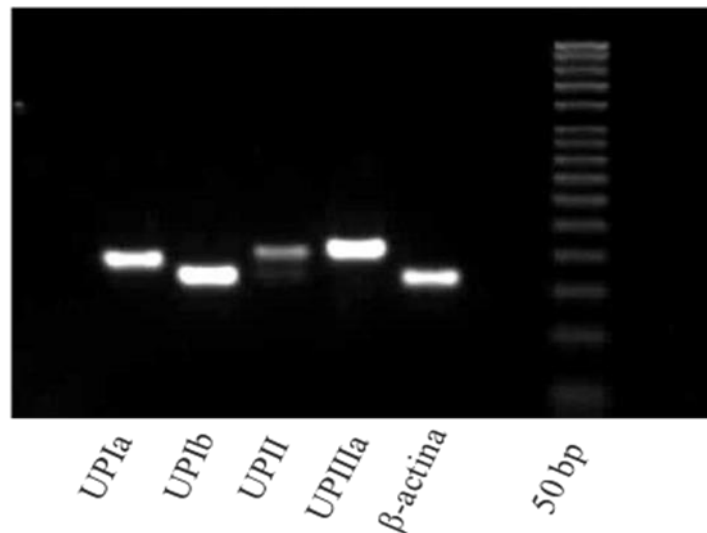


Fig. 4.4-Gel rappresentativo delle bande ottenute dopo amplificazione (RT-PCR) delle quattro uroplachine caricate nell'ordine: Ia, Ib, II, IIIa.

Allo scopo di completare i dati ottenuti con Real-time PCR, è stata condotta una valutazione dei livelli proteici, tramite western blot, delle due più interessanti uroplachine: la UPIa, riconosciuta come ligando preferenziale per ceppi di *E. coli* dotati della fimbria di tipo I, e la UPIIIa, l'unica delle Ups con un dominio citosolico e coinvolta in meccanismi apoptotici.

I dati ottenuti dall'analisi densitometrica relativa agli estratti proteici non hanno mostrato un perfetto accordo con i livelli degli mRNA ottenuti tramite qPCR.

Infatti, relativamente alla UPIa, se i livelli di espressione dell'mRNA subivano un decremento dopo sette giorni dall'induzione del trauma e un successivo aumento a quindici giorni, per quanto riguarda i livelli proteici, si registra un continuo incremento durante tutto il time course (**Fig. 4.5**).

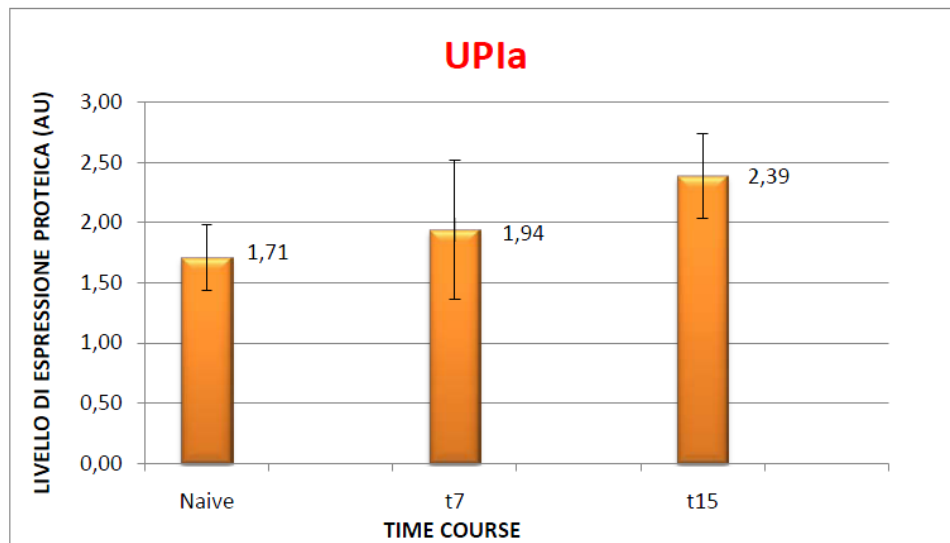


Fig. 4.5- Livelli di espressione proteica della UPIa in topi SCI sacrificati a sette e quindici giorni dall'induzione del danno midollare, confrontati con quelli ottenuti in topi naive. In figura sono indicate le deviazioni standard.

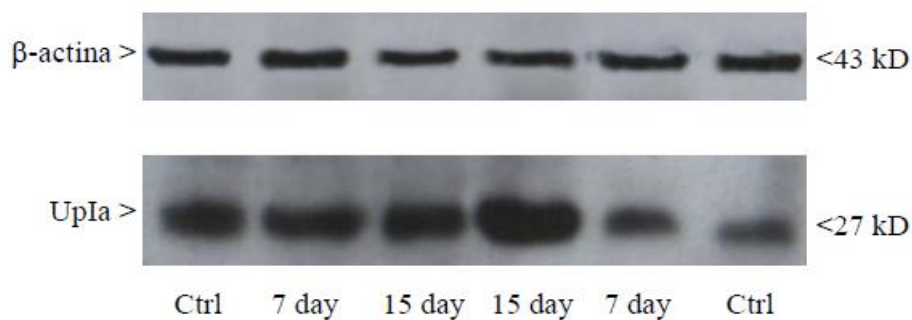


Fig.4.6 Analisi in western blot della UPIa su estratti proteici ottenuti da vesciche di topi SCI sacrificati a sette e quindici giorni dall'induzione del danno e di topi naive. Come housekeeping per la normalizzazione è stata scelta la β-actina.

Per quanto riguarda invece la UPIIIa, dopo sette giorni dall'induzione del trauma midollare i suoi livelli di espressione subiscono un decremento rispetto ai livelli dei controlli; fanno poi registrare un incremento dopo quindici giorni, anche se i livelli proteici non raggiungono quelli misurati nei controlli (**Fig. 4.7**).

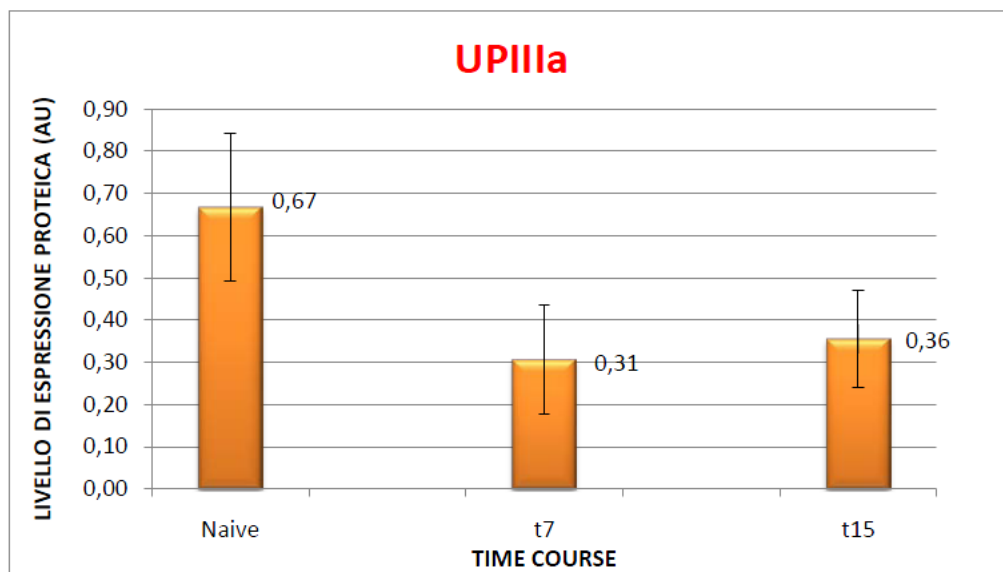


Fig. 4.7- Livelli di espressione proteica della UPIIIa in topi SCI sacrificati a sette e quindici giorni dall'induzione del danno midollare, confrontati con quelli ottenuti in topi naive. In figura sono indicate le deviazioni standard.

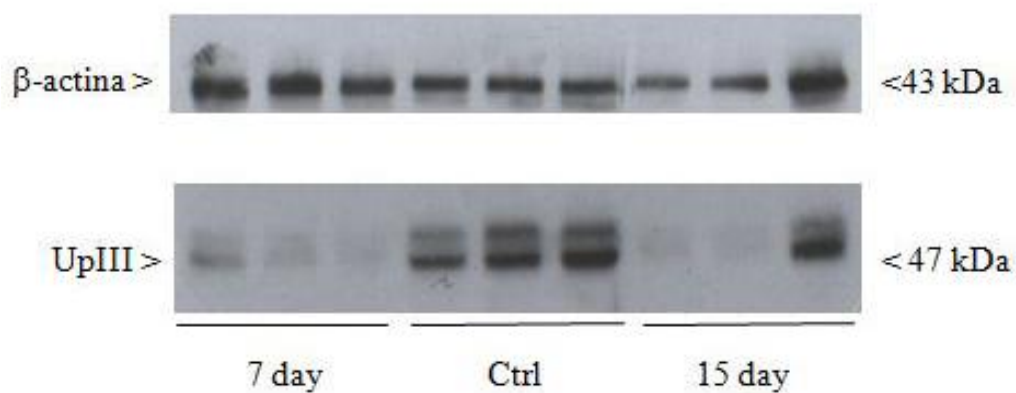


Fig. 4.8- Analisi in western blot della UPIIIa su estratti proteici ottenuti da vesciche di topi SCI sacrificati a sette e quindicigiorni dall'induzione del danno e d topi naive. Come housekeeping per la normalizzazione è stata scelta la β -actina.

Per verificare se il trauma midollare indotto potesse alterare il traffico delle vescicole fusiformi contenute nelle cellule a ombrello e, di conseguenza, modificare la concentrazione delle uroplachine a livello della superficie apicale delle cellule a ombrello, si è deciso di seguire anche il livello di espressione di Rab27b (**Fig. 4.9**). Il trend di Rab27b è molto simile a quello delle uroplachine: infatti, anche questa proteina subisce una riduzione a sette giorni e un leggero rialzo dopo quindici giorni.

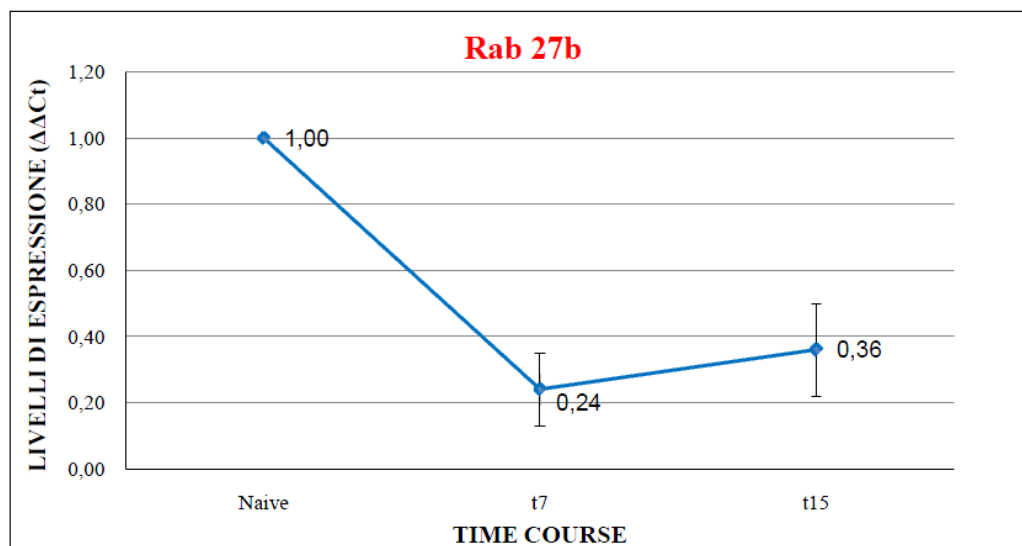


Fig. 4.9- Livelli di espressione di Rab27b in vesciche ottenute da topi SCI sacrificati dopo sette (n=5) e quindici giorni (n=5) dall'induzione del trauma, rispetto a topi naive (n=7) e. L'analisi è stata effettuata in RTqPCR, mediante il metodo del $\Delta\Delta C_t$ [35]. Come gene housekeeping è stata scelta la β -actina.

Alla luce di questa prima serie di dati, considerando anche il ruolo svolto dall'AMP ciclico nella omeostasi dell'uroepitelio, si è teorizzato che potesse coesistere un segnale costimolatorio coinvolto nel processo di internalizzazione (o estrusione/clearance) batterica.

I recettori metabotropici per il glutammato costituivano dei candidati ideali per le nostre indagini. Si è proceduto quindi ad una verifica a tutto campo della presenza in vescica di topo dei recettori metabotropici del glutammato.

È stata dapprima condotta un'analisi in RT-PCR su cDNA ottenuto da vesciche di topi C57Black/6N, che ha permesso di rivelare l'espressione selettiva dei recettori mGlu3 (396 bp), mGlu7 (101 bp) e mGlu8 (133 bp) (**Fig. 4.10**).

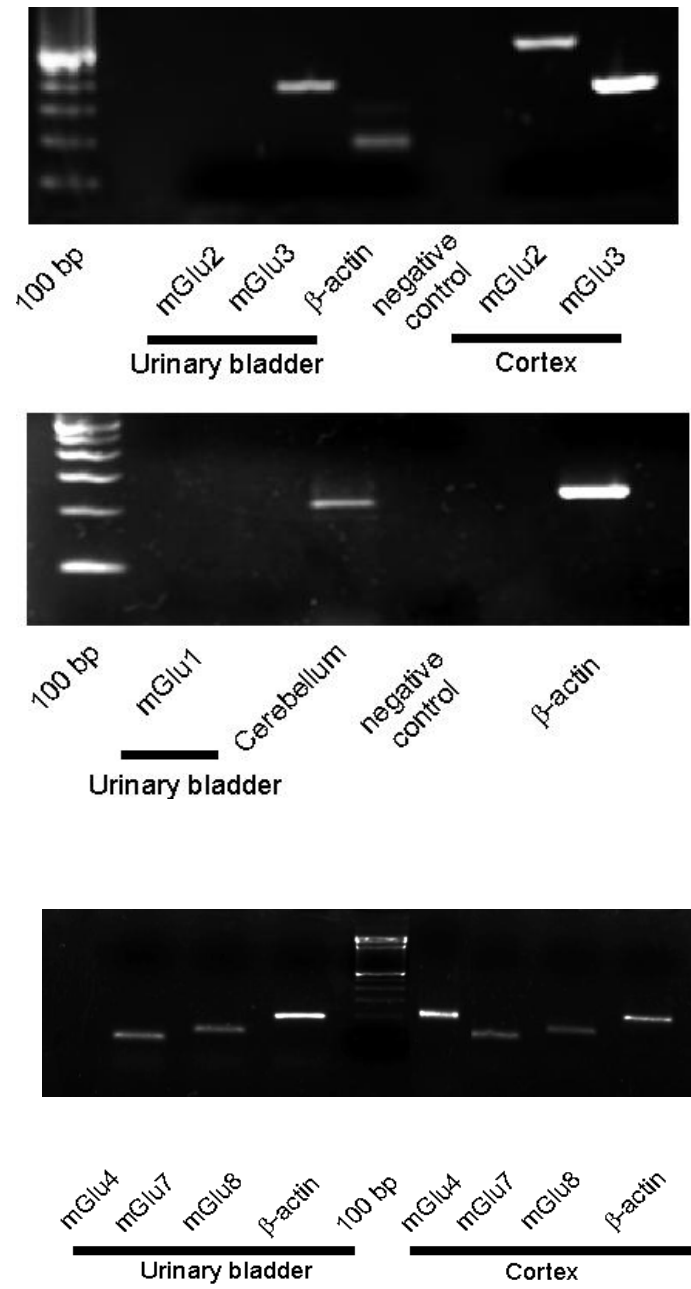


Fig. 4.10-Analisi in RT-PCR dei recettori mGlu1, mGlu2, mGlu3, mGlu4, mGlu7 and mGlu8 nella vescica urinaria di topo maschio C57Black/6N. La corteccia cerebrale di topo è utilizzata come controllo positivo.

È stata poi eseguita un'analisi di estratti proteici di vescica di topo C57Black/6N mediante western blot, che ha consentito di rivelare l'espressione del recettore mGlu2/3 (l'anticorpo utilizzato riconosce una porzione comune ai recettori mGlu2 e mGlu3 (**Fig. 4.11**).

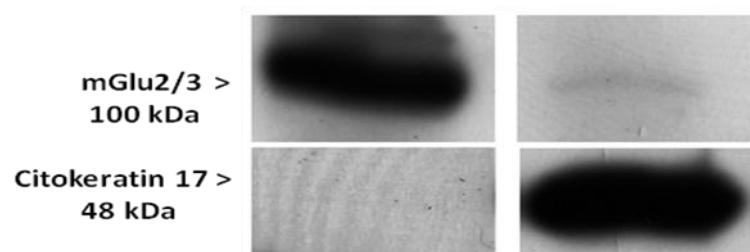


Fig. 4.11- Espressione di mGluR2/3 in Western Blot da estratti proteici di vesciche prelevate da topi C57Black/6N. Come controllo interno è stata usata la citocheratina 17, marker dell'uroepitelio.

Al fine di valutare se gli mGluRs fossero presenti specificatamente a livello degli uroepiteliociti, è stata esaminata la distribuzione cellulare della proteina mGlu2/3 mediante immunistoichimica specifica per mGlu2/3.

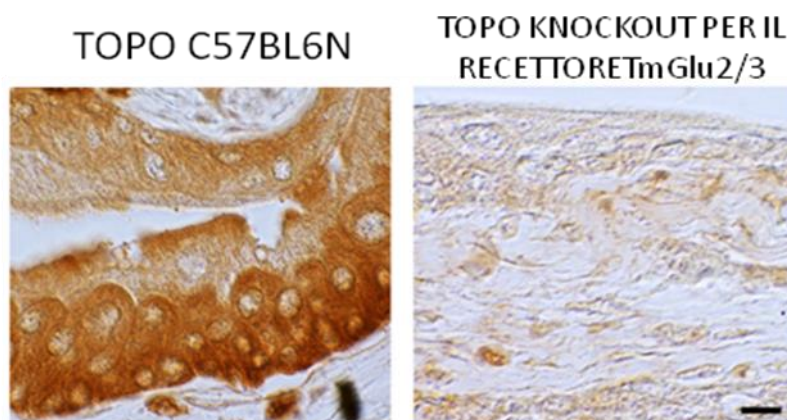


Fig. 4.12- Specificità dell'anticorpo anti-mGlu2/3 in immunistoichimica. Il topo knockout per il recettore mGlu2/3 non mostra nessuna immunoreattività.

L'analisi in immunofluorescenza del recettore mGlu2/3 in topi maschi C57Black/6N mostra un'intensa immunoreattività negli strati cellulari basale ed intermedio. Le cellule a ombrello sono risultate scarsamente marcate per il recettore mGlu2/3 (**Fig. 4.13**).

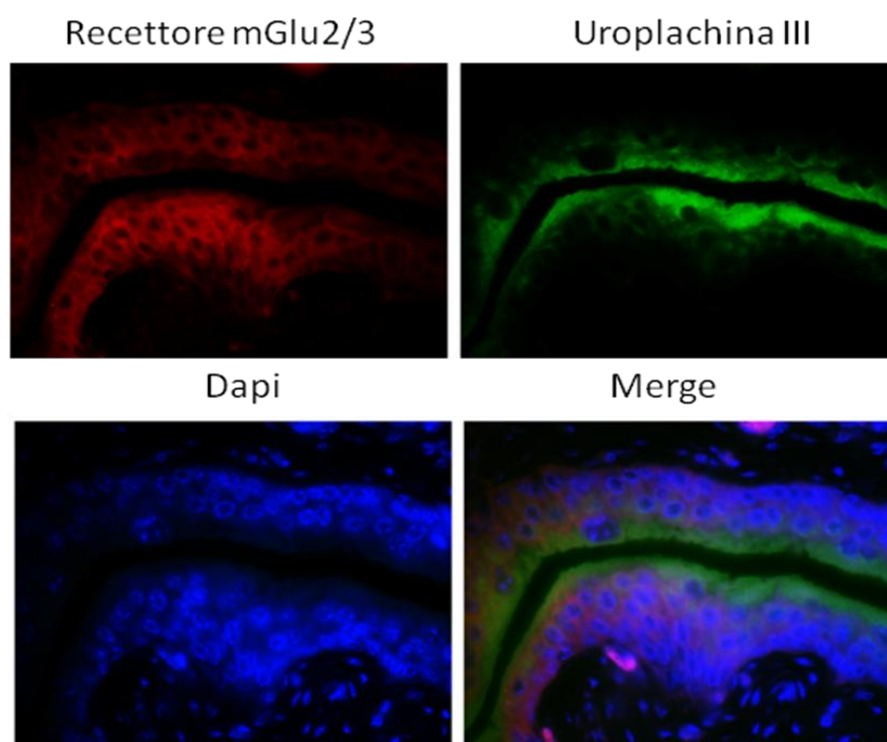


Fig. 4.13- Immunofluorescenza del recettore mGlu2/3 in topi maschi C57Black/6N. L'analisi mostra una marcata positività per il recettore negli strati intermedio e basale.

Per verificare se si trattasse del recettore mGlu 2 o mGlu3, sono state effettuate delle colorazioni in immunofluorescenza sia nel topo knockout per il recettore mGlu2 (**Fig. 4.14**) che nel knockout per il recettore mGlu3 (**Fig. 4.15**).

Nei topi knockout per il recettore mGlu2, l'immunoreattività per i recettori mGlu2/3 è completamente preservata. Le cellule a ombrello risultano negative.

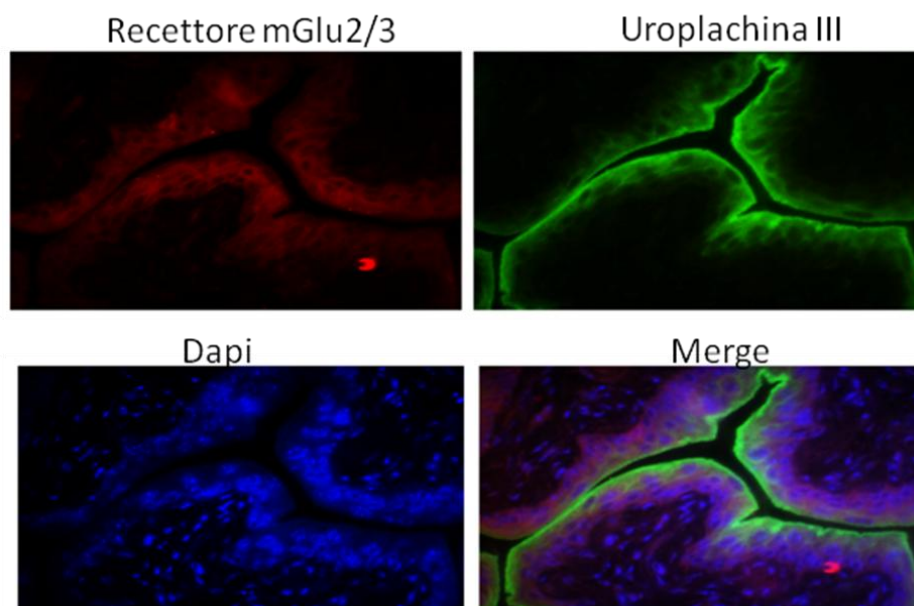


Fig. 4.14- Immunofluorescenza del recettore mGlu2/3 nei topi knockout per il recettore mGlu2. L'analisi mostra una marcata positività per il recettore negli strati intermedio e basale.

Al contrario, nei topi knockout per mGluR3, l'immunoreattività per la proteina mGluR2/3 è completamente assente.

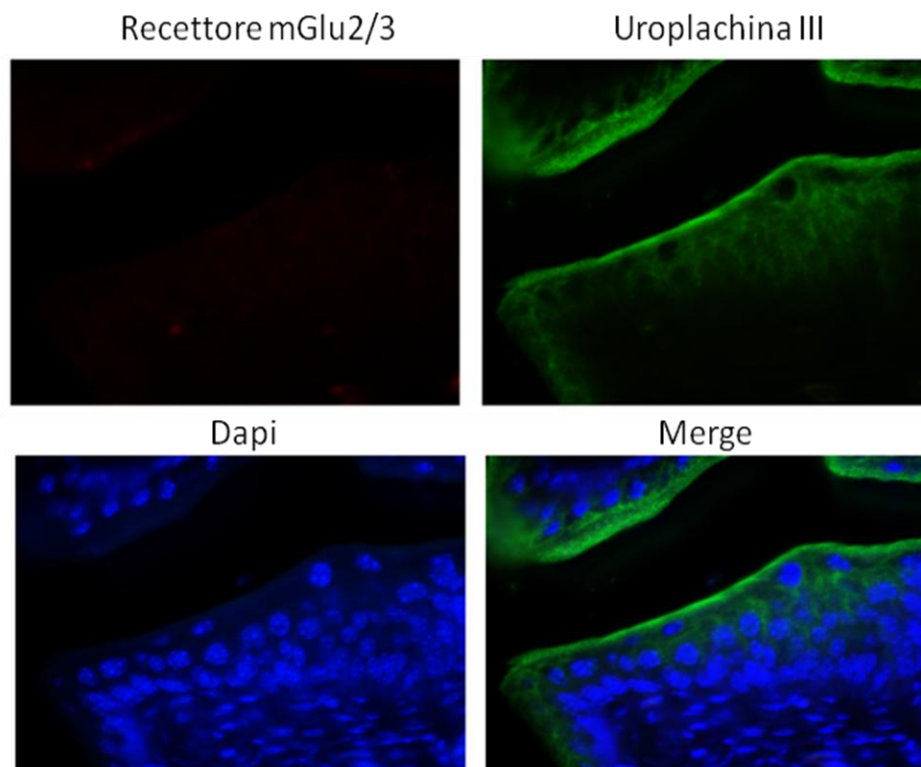


Fig. 4.15- Immunofluorescenza del recettore mGlu2/3 nei topi knockout per il recettore mGlu3. La positività per la proteina mGlu2/3 risulta persa.

Le analisi effettuate hanno permesso di concludere che l'uroepitelio della vescica di topo esprime il recettore mGlu3.

Si è deciso, in seguito, di valutare se la modulazione farmacologica con agonisti o antagonisti di mGluR3, che in condizioni fisiologiche tende a far diminuire la concentrazione di cAMP, potesse influenzare l'adesione o l'internalizzazione del patogeno nel contesto uroteliale: è stato quindi messo a punto un saggio di

internalizzazione batterica con ceppi di *E. coli* uropatogeni, utilizzando una linea cellulare di uroepiteliociti di carcinoma vescicale, previa caratterizzazione molecolare e verifica dell'espressione delle Up1b, Up3a e mGluR3 (**Fig. 4.16**).

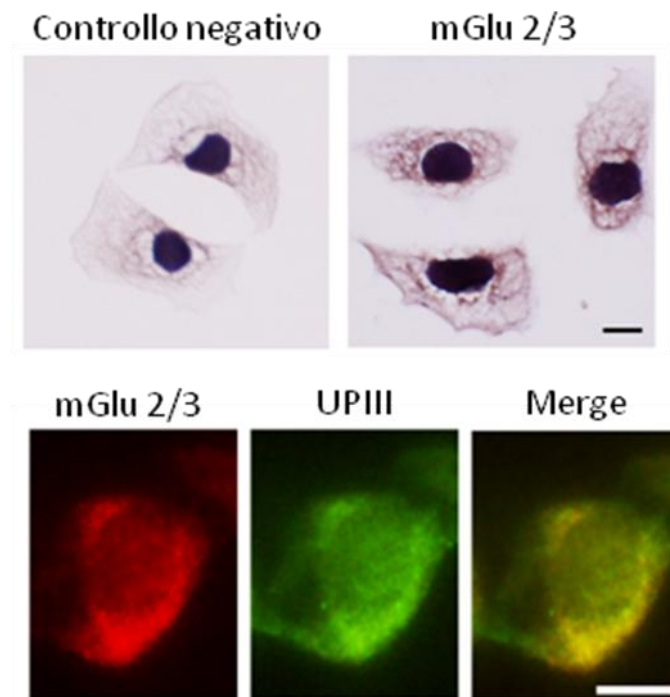


Fig. 4.16- Immunoperoxidasi del recettore mGlu 2/3 nella linea cellulare 5637 e immunofluorescenza nella linea cellulare 5637 che mostra la positività per il recettore mGlu2/3 e per l'uroplachina UPIII.

Per verificare se mGluR3 riveste un ruolo funzionale nel processo di internalizzazione batterica, alcuni esperimenti sono stati condotti utilizzando agonisti ed antagonisti recettoriali del mGluR3.

Come agonista è stato scelto il farmaco LY379268 e come antagonista il farmaco LY341495.

Un numero svariato di agonisti dei recettori di gruppo II è stato identificato: tra i più potenti LY379268 (hexane-4,6-dicarboxylic acid), che esibisce un'alta affinità nanomolare verso mGluR2 e mGluR3.

Il più potente antagonista dei recettori di gruppo II identificato, LY341495 (2S-2-amino-2-propanoic acid), esibisce un'affinità nanomolare sia per mGluR2 che mGluR3 [29], (**Fig. 4.17**).

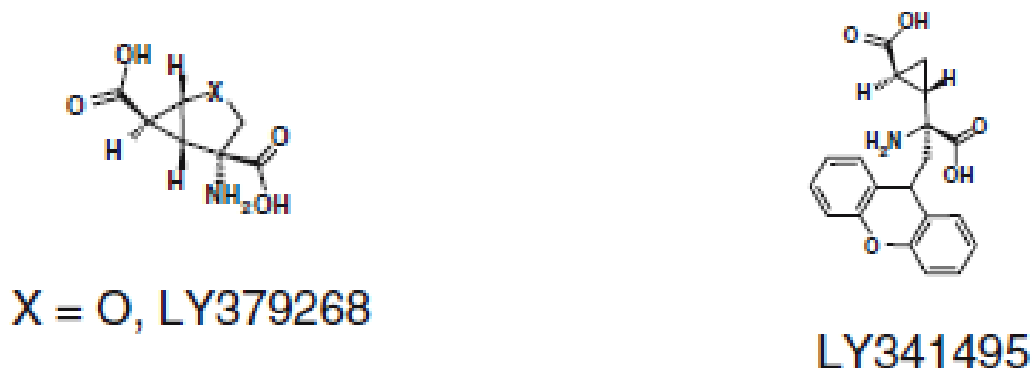


Fig. 4.17- Struttura chimica dell'agonista LY379269 e dell'antagonista LY341495 [29].

Il trattamento delle cellule infettate con un ceppo di *E. coli* uropatogeno con l'agonista LY379268 riduce significativamente il numero di colonie batteriche internalizzate. L'effetto ottenuto in seguito al trattamento con l'antagonista risulta paragonabile a quello registrato nelle cellule non trattate. Come controllo positivo è stato usato il forskolin (originato dall'erba asiatica *Coleus forskohlii*), potente attivatore del cAMP [24], (**Fig. 4.18**).

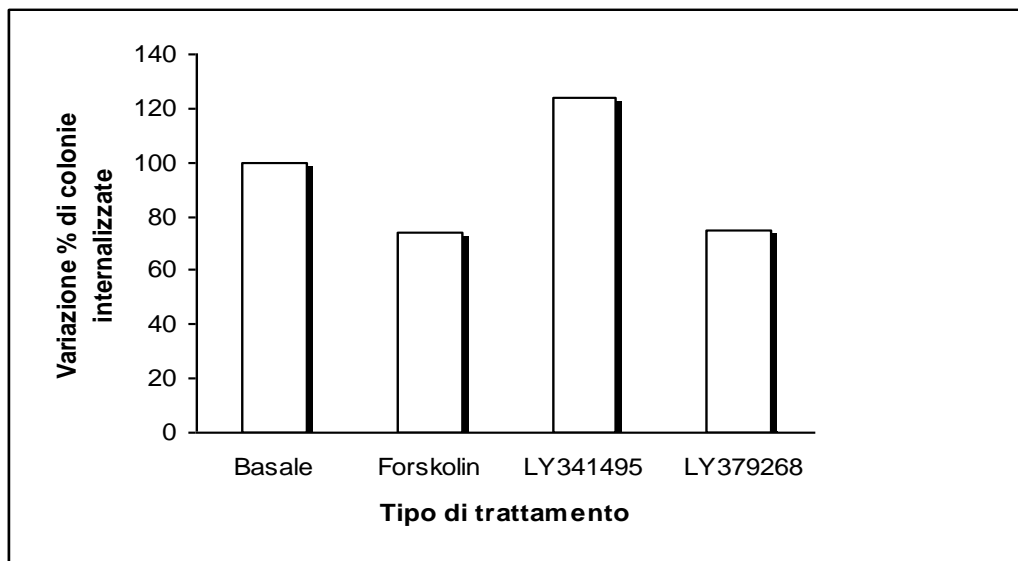


Fig. 4.18-Test di internalizzazione sulla linea cellulare 5637. Gli uroepitelioцитi sono stati infettati con *E. coli* O2 e trattati con forskolin, LY341495 e LY 379268. Viene riportata la variazione percentuale di colonie internalizzate rispetto alla condizione basale. I risultati sono la media di due esperimenti indipendenti..

Il test di internalizzazione batterica è stato effettuato anche mediante lettura al citofluorimetro, dopo aver marcato un ceppo di *E. coli* uropatogeno con carbossi-fluorescina e aver infettato la linea cellulare 5637. Anche in questo caso, l'agonista ha ridotto il numero di colonie batteriche internalizzate (**Fig. 4.19**).

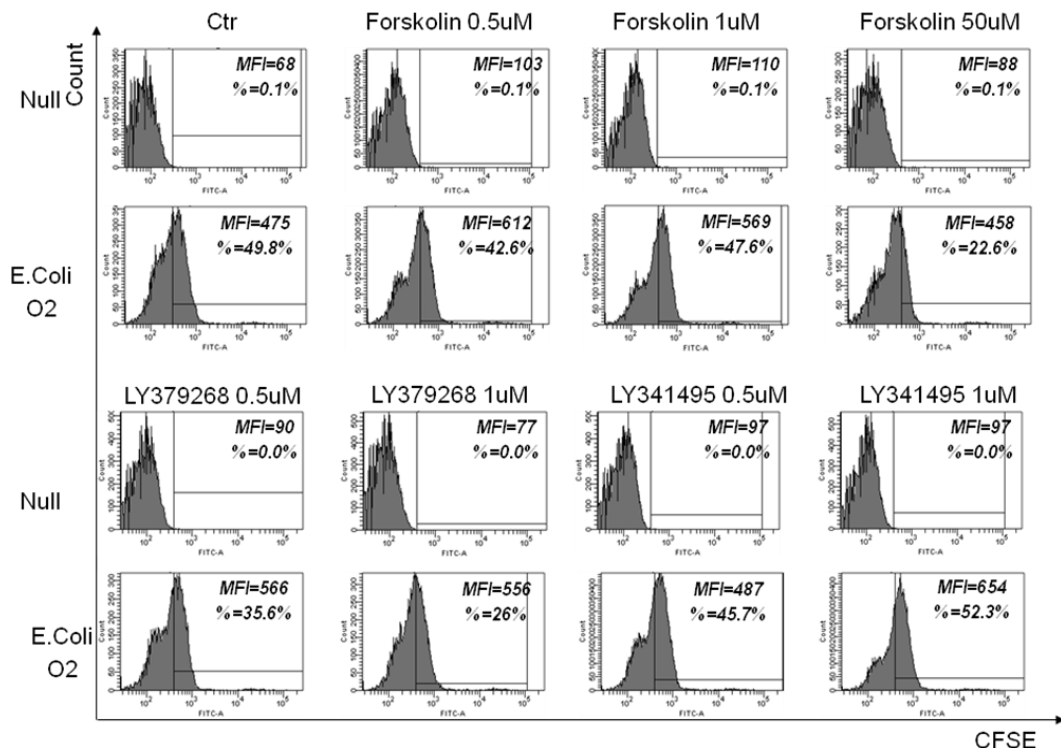


Fig. 4.19-Test di internalizzazione sulla linea cellulare 5637 mediante FACS. Gli uroepitelioцитi sono stati infettati con *E. coli* O2 marcato con CFSE e trattati con Forskolin, LY341495 e LY 379268.

Allo scopo di indagare il meccanismo d'azione, abbiamo effettuato una misurazione dei livelli di cAMP sulla linea cellulare 5637, dopo trattamento con agonista e antagonista di mGlu3.

L'agonista LY379268 induce un incremento di cAMP, paragonabile ai livelli fatti registrare con il forskolin e superiore a quelli ottenuti con il trattamento con LY341495 (**Fig. 4.20**).

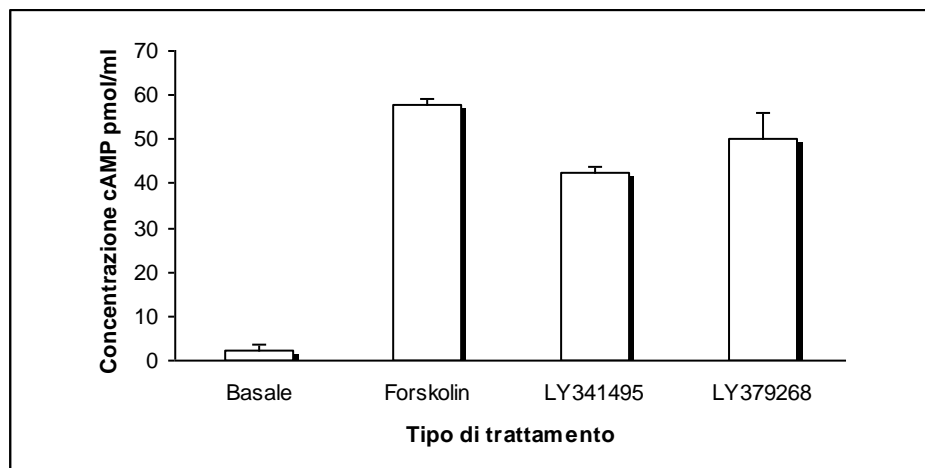


Fig. 4.20-Livelli di cAMP nella linea cellulare 5637 dopo trattamento con forskolin, LY341495 e LY 379268.

La parte finale dello studio ha previsto l'analisi di una biopsia di vescica umana, allo scopo di verificare la presenza del recettore mGlu2/3 anche nell'uomo: l'analisi in immunohistochimica ha consentito di confermare la stessa distribuzione ottenuta per la proteina mGluR2/3 nel topo anche nell'uomo (**Fig. 4.21**).

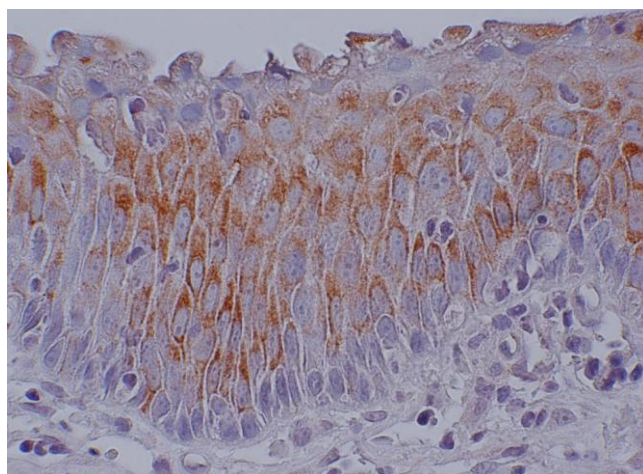


Fig. 4.21- Immunohistochimica del recettore mGlu2/3 in una biopsia di vescica umana.

5. CONCLUSIONI

Le UTIs sono fra le infezioni umane di più comune riscontro nella pratica medica e costituiscono una complicanza frequente in numerose patologie neurodegenerative, caratterizzate da un'alterazione dei normali meccanismi di regolazione vescico-sfinterici. Sono provocate principalmente da specie di *E.coli* uropatogeni, in grado di infettare le cellule uroepiteliali mediante specifiche interazioni tra le adesine del patogeno e i recettori della cellula ospite. Poichè numerosi dati di letteratura supportano l'idea che i cambiamenti morfo-fisiologici dell'urotelio conseguenti a traumi midollari possano determinare la maggiore predisposizione alle UTIs, la nostra ricerca è iniziata con lo studio dell'espressione di markers di differenziamento uroteliale e dei principali componenti delle placche uroteliali in modelli murini di neurodegenerazione di natura traumatica (SCI). I risultati ottenuti portano a pensare che la maggiore incidenza di UTIs potrebbe essere collegata alle variazioni della integrità della superficie uroteliale che si verificano in corso di vescica neurologica e che rendono l'epitelio vescicale più vulnerabile all'attacco dei batteri.

Dai dati emersi appare evidente che in seguito a trauma midollare si genera una compromissione della integrità superficiale dell'urotelio, che potrebbe spiegare, almeno in parte, la maggiore predisposizione dei pazienti con patologie neurodegenerative alle infezioni delle vie urinarie.

In particolare, l'abbassamento dei livelli di espressione del marker di differenziamento apicale dell'urotelio (CK20) segnala la perdita dell'integrità dello

strato superficiale dell'urotelio e, contemporaneamente, la sovraespressione della CK17 suggerisce la risposta proliferativa degli strati intermedio e basale.

Anche il comportamento delle uroplachine conferma il cambiamento morfologico dell'urotelio: infatti, l'abbassamento del loro livello dopo sette giorni dall'induzione del trauma segnala la significativa alterazione morfo-funzionale dell'uroepitelio, e ciò potrebbe essere determinante nella patogenesi delle infezioni urinarie in condizioni di denervazione midollare.

Successivamente, l'aumento dei livelli di espressione delle uroplachine dopo quindici giorni dal trauma indica che gli strati intermedio e basale attivano dei processi proliferativi, segnalando il meccanismo riparativo dello strato superficiale che l'epitelio tende ad avviare.

Le uroplachine sono largamente presenti anche nelle vescicole fusiformi, caratterizzate dalla presenza della GTPasi Rab27b, nel citoplasma delle cellule a ombrello, la cui funzione è quella di regolare la concentrazione di uroplachine sulla superficie luminale delle cellule dello strato superficiale.

L'andamento di Rab27b suggerisce che, subito dopo l'induzione del trauma, si verifica un aumento del traffico delle vescicole verso la superficie delle cellule a ombrello.

Per due delle uroplachine è stata eseguita anche una valutazione dei livelli proteici tramite western blot: l'analisi è stata compiuta per la UPIa, recettore per *E. coli* fimbriati, e per la UPIIIa, coinvolta nella trasduzione del segnale e in meccanismi apoptotici.

Mentre per la UPIIIa i livelli proteici sono risultati in accordo con quelli ottenuti per l'mRNA, la UPIa, contrariamente ai dati ottenuti in qPCR, mostra livelli lievemente aumentati durante il time course.

Tale andamento potrebbe essere spiegato dal fatto che la UPIa, sebbene principalmente prodotta dalle cellule dello strato superficiale, risulta presente in misura minore anche nello strato intermedio.

I dati emersi forniscono quindi una ragione della maggiore incidenza di UTIs in corso di trauma midollare, che sembrerebbe causata da un'aumentata vulnerabilità dell'urotelio all'ingresso di batteri uropatogeni, in seguito ad un'alterazione morfo-funzionale dello strato superficiale e all'incrementata espressione della UPIa, ligando preferenziale per la fimbria di tipo 1 di *E.coli*, negli strati sottostanti in condizioni proliferative. Ricercando altri segnali costimolatori possibilmente coinvolti nel processo di internalizzazione batterica, la seconda parte dello studio ha permesso di descrivere per la prima volta la presenza in vescica di topi dei recettori metabotropici del glutammato (da noi già studiati per il loro coinvolgimento con il sistema immune).

L'analisi in RT-PCR da cDNA di vesciche di topi, la prima indagine effettuata, ha rivelato l'espressione selettiva del recettore mGlu3.

L'analisi in western blot di estratti proteici di vescica ha evidenziato l'espressione della proteina mGluR2/3, poichè l'anticorpo utilizzato è in grado di legare una porzione comune ai recettori mGlu2 e mGlu3.

Sono state successivamente condotte delle analisi in immunoistochimica, che hanno consentito non solo di affermare che mGluR2/3 sia specificatamente presente a livello degli uroepiteliociti, in particolare a livello degli strati intermedio e basale, ma

che si tratti del recettore mGlu3, grazie all'utilizzo di topi knockout per mGlu2 e mGlu3. Si procederà, in futuro, all'analisi dei recettori mGlu7 e mGlu8 in vescica anche mediante western blot ed immunoistochimica.

Dopo aver verificato che nell'uroepitelio fosse presente mGluR3, che in condizioni fisiologiche tende a far diminuire la concentrazione di cAMP, si è deciso di verificare se la modulazione farmacologica con agonisti o antagonisti di tale recettore potesse influenzare il meccanismo di internalizzazione del patogeno nelle cellule uroteliali, attraverso dei saggi di internalizzazione batterica con un ceppo di *E. coli* uropatogeno su una linea cellulare di uroepiteliociti di carcinoma vescicale, esprimente le UPIb, UPIIIa e mGluR3. Il trattamento delle cellule infettate con l'agonista LY379268 ha ridotto significativamente il numero di colonie batteriche internalizzate. Per verificare se tale fenomeno potesse essere collegato ad una variazione della concentrazione intracellulare di cAMP, è stata effettuata una misurazione dei livelli di cAMP in seguito a trattamento con agonista e antagonista, della linea cellulare, che ha consentito di verificare un innalzamento del mediatore cellulare dopo stimolazione con l'agonista. Questo dato spinge a pensare che la presenza nell'uroepitelio dei recettori metabotropici per il glutammato possa giocare un ruolo fondamentale nei meccanismi di difesa messi in atto dalle cellule uroepiteliali, e che la loro modulazione farmacologica possa influenzare il processo di internalizzazione batterica nell'urotelio anche *in vivo*.

Tale ipotesi è avvalorata anche da altri dati di letteratura, oltre al fatto che *Escherichia coli* è in grado di sintetizzare attivamente glutammato.

Sebbene l'ipotesi di partenza ci ha portato a pensare che il meccanismo d'azione degli mGluRs potesse dipendere da variazioni della concentrazione intracellulare di

cAMP, i dati ottenuti dalla modulazione farmacologica, in particolare in relazione all'effetto ottenuto dall'azione dell'agonista, suggeriscono l'idea che la via dei metabotropici nel processo di esocitosi batterica possa coinvolgere altri intermedi di segnalazione e meccanismi d'azione cAMP indipendenti. Tali studi saranno oggetto di futuri approfondimenti.

In relazione ai risultati ottenuti nel presente lavoro, anche in considerazione del fatto che tale attività scientifica ha portato a dimostrare la presenza della proteina mGluR3 anche nella vescica umana, si può pensare che i farmaci modulatori degli mGluRs possano costituire presidi terapeutici innovativi nel trattamento delle UTIs, aprendo una nuova prospettiva per il loro impiego principalmente nella clinica delle infezioni urinarie ricorrenti (rUTIs). Ciò appare ancora più interessante se si considera che la somministrazione ciclica di antibiotici rappresenta l'approccio oggi in uso ma non sempre è risolutivo. La terapia protratta certamente contribuisce ad alimentare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Andriole V. T., Patterson T. F. (1991) "Epidemiology, natural history, and management of urinary tract infection in pregnancy". *Med Clin North Am*, 75:359-373;
- [2] Patton J. P., Nash D. B., Abrutyn E. (1991) "Urinary tract infection: Economic considerations". *Med Clin North Am*, 75:495-513;
- [3] P., Cocco L., De Barbieri A., D'Este L., Floriani F., Gheri G., Mondello M.R., Papa S., Petriglieri P., Pizzini G., Ridola C., Rossi S., Sacchi G., Sirigu P., Spinella S., *Anatomia umana*, edi-ermes, 1999;
- [4] Lanciotti E., *Principi di microbiologia clinica*, Casa Editrice Ambrosiana, 2007;
- [5] Thumbikat P., Berry R. E., Zhou G., Billips B. K., Yaggie R. E., Zaichuk T., Sun T. T., Schaeffer A. J., Klumpp D. J. (2009) "Bacteria-Induced Uroplakin Signaling Mediates Bladder Response to Infection". *Plos Pathog.*, Vol.5: 1-17;
- [6] Harvey R., Champe P.C., Fisher B. D., *Le basi della microbiologia*, Zanichelli, 2008;
- [7] Molina Romanzi, "Microbiologia clinica: *gli aspetti microbiologici delle malattie infettive*", UTET, 187-196.
- [8] Connell H., Hedlund M., Agace W., Svanborg C. (1997) "Bacterial Attachment to uro-epithelial cells: mechanisms and consequences". *Advances in dental research*, Vol.11 (1):50-58;

- [9] Birder L. A. & De Groat W. C. (2007) “Mechanisms of Disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction”. *Nature clinical practice. Urology*, Vol.4 (1): 54-46;
- [10] Hu C. C., Liang F. X., Zhou G., Tu L., Tang C. H., Zhou J., Kreibich G., Sun T.T. (2005) “Assembly of Urothelial Plaques: Tetraspanin Function in Membrane Protein Trafficking”. *Molecular Biology of the Cell*, Vol.16: 3937–3950;
- [11] Wu X. R., Medina J. J., Sun T. T. (1995) “Selective interactions of UPIa and UPIb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells”. *The Journal of biological chemistry*, Vol.270: 29752–29759;
- [12] Tu L., Sun T. T., Kreibich G. (2002) “Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum”. *Molecular biology of the cell*, Vol.13: 4221–4230;
- [13] Wu X. R., Kong X. P., Pellicer A., Kreibich G., Sun T. T. (2009) “Uroplakins in urothelial biology, function, and disease”. *Kidney International*, Vol.75: 1153-1165;
- [14] Xie B., Zhou G., Chan S. Y., Shapiro E., Kong X. P., Wu X. R., Sun T. T., Costello C. E. (2006) “Distinct glycan structures of uroplakins Ia and Ib: structural basis for the selective binding of FimH adhesin to uroplakin Ia”. *The Journal of biological chemistry*, Vol.281: 14644–14653;
- [15] Wu X. R., Sun T. T. (1993) “Molecular cloning of a 47 kDa tissue-specific and differentiation-dependent urothelial cell surface glycoprotein.”, *Journal of cell science*, Vol.106 (1): 31–43;
- [16] Yu J., Lin J. H., Wu X. R., Sun T. T. (1994) “Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four

transmembrane domain (4TM) proteins”. *The Journal of cell biology*, Vol.125: 171–182;

-[17] Sobel, J. D. (1997) “Pathogenesis of urinary tract infection. Role of host defenses”. *Infectious disease clinics of North America*, Vol.11, 531–549;

- [18] Mulvey M. A., Schilling J. D., Martinez J. J. & Hultgren S. J. (2000) “Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.97 (16): 8829–8835;

- [19] Martinez J. J., Mulvey M. A., Schilling J. D., Pinkner J. S. & Hultgren S. J. (2000) “Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells”. *The EMBO Journal*, Vol.19 (12), 2803-2812;

- [20] Zhou G., Mo W. J., Sebbel P., Min G., Neubert T. A., Glockshuber R., Wu X. R., Sun T. T. & Kong X. P. (2001) “Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding”. *Journal of Cell Science*, Vol.114: 4095-4103;

- [21] Wu X. R., Sun T. T., Medina J. J. (1996) “In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.93: 9630–9635;

- [22] Blango, M. G. & Mulvey, M. A. (2010) “Persistence of Uropathogenic *Escherichia coli* in the Face of Multiple Antibiotics”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 54: 1855-1863;

- [23] Song J., Bishop B. L., Li G., Grady R., Stapleton A. & Abraham S. (2009) “TLR4-mediated expulsion of bacteria from infected bladder epithelial cells”.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 106: 14966-14971;

- [24] Bishop B. L., Duncan M. J., Song J., Li G., Zaas D., Abraham S. N. (2007) "Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells". *Nat Med.* 13(5):625-30;

- [25] Del Popolo G., "La vescica neurologica", *SODS di Neuro-Urologia, Unità Spinale, A.O.U. Careggi, Firenze*;

- [26] Apodaca G., Kiss S., Ruiz W., Meyers S., Zeidel M., Birder L. (2003) "Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury". *American journal of physiology. Renal physiology*, Vol.284: F966-F976;

- [27] Birder L., De Groat W., Mills I., Morrison J., Thor K., Drake M. (2010) "Neural control of the lower urinary tract: peripheral and spinal mechanisms". *Neurourol Urodyn*, 29(1):128-39;

- [28] Birder L. A. (2005) More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain". *Am J Physiol Renal Physiol.*, 289(3):F489-95;

- [29] Kew J. N. C. , Kemp J. A. (2005) "Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology". *Psychopharmacology*, 179: 4–29;

- [30] Helling R. B., (1998) "Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia Coli*". *Journal Of Bacteriology*, P. 4571–4575.

- [31] Helling R. B., (1994) "Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate?". *Journal Of Bacteriology*, P. 4664-4668.

- [32] Julio-Pieper M., Flor P. J., Dinan T. G., Cryan J. F., (2011) “Exciting Times beyond the Brain: Metabotropic Glutamate Receptors in Peripheral and Non-Neural Tissues”. *Pharmacol Rev*, 63(1):35-58.

- [33] Anwyl R (1999) “Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity”. *Brains Res Rev*, 29:83–120;

- [34] Southgate J., Harnden P., Trejdosiewicz L. K. (1999) “Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol.*, 14:657-664.

- [35] Pfaffl M. W. (2001) “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR”. *Nucleic acids research*, Vol. 29 (9): 2002-2007.